



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA.**

IDENTIFICACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DEL HLA-DRB1 CON
POLIPOSIS NASAL SIMPLE, MEDIANTE LA TIPIFICACIÓN DE
LOS ALELOS POR SSP Y SSOPs.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

P R E S E N T A :

MARÍA ISABEL DÍAZ PAVÓN



Tutora: Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR E HISTOCOMPATIBILIDAD DEL HOSPITAL GENERAL
Dr. MANUEL GEA GONZALEZ, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DOCTORA MARÍA ANGÉLICA ALFONSINA OLIVO DÍAZ.**

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a toda la gente que quiero en especial a esa personita que no esta entre nosotros.

A mis padres Juana y Fernando. Quienes siempre han estado en todos los instantes de mi vida apoyándome en todo momento y siempre han creído en mí, los amo.

A Rolando. Quien ha estado en las buenas y en las malas conmigo apoyándome, alentándome y cuidándome, te amo.

A mis hermanas: Fernanda y Claudia. Quienes me apoyan y cuidan.

A mis Abuelitos. Quienes me dan todo su cariño y apoyo.

A mi bisabuelita, te extraño mucho.

A toda mí familia Díaz y Pavón, por estar juntos cuando lo necesite.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Angy Olivo:

Por su gran paciencia, cariño, comprensión, dedicación, apoyo, humildad; ya que compartió sus conocimientos y profesionalismo en cada momento desde que la conocí y en la realización de la tesis.

Deseándole lo mejor para su vida y carrera. Nunca cambie Doctora Angy, la quiero mucho.

A la QFB Paty Vidal y QFB Pablo, por su paciencia y por sus grandes y sabios consejos.

A la Doctora Georgina González Ávila, quien me dio excelentes consejos y me ha apoyado en todo momento.

A mis compañeros y amigos, que contribuyeron de diferentes maneras en la elaboración de mi tesis:

Al Biólogo Tello, TLC Temo, QFB Adelita, QFB Alejandro, QFB Rosi, por todos los buenos momentos que pasamos juntos incluyendo sus muy buenos consejos, los quiero.

A la Médico Meche, quien me apoyo en mi tesis y alegro siempre mi estancia en el laboratorio.

A la M en C. Mirza Romero, Doctor Joel quienes siempre me apoyaron ante cualquier duda.

A la TLC Chio y Bióloga Betty, quienes me apoyaron en todo momento.

Índice

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA | 9 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 10 |
| JUSTIFICACIÓN | 10 |
| OBJETIVO | 10 |
| HIPÓTESIS | 10 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| <i>Pacientes con poliposis nasal</i> | <i>11</i> |
| <i>Testigos</i> | <i>11</i> |
| <i>Extracción de DNA</i> | <i>11</i> |
| TIPIFICACIÓN DE LOS ALELOS DRB1..... | 11 |
| <i>Cuantificación del DNA</i> | <i>11</i> |
| <i>Amplificación del DNA</i> | <i>11</i> |
| <i>Verificación de la amplificación</i> | <i>11</i> |
| TIPIFICACIÓN CON OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS POR EL MÉTODO DE SONDAS ESPECÍFICAS DE SECUENCIA (SSOPs)..... | 12 |
| <i>Sembrado de las muestras</i> | <i>12</i> |
| <i>Marcaje de los SSOs</i> | <i>12</i> |
| <i>Prehibridación e hibridación de las membranas</i> | <i>12</i> |
| SONDAS RECOMENDADAS POR EL XII TALLER INTERNACIONAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD PARA LA TIPIFICACIÓN DE LOS GENES CLASE II..... | 16 |
| <i>Quimioluminiscencia</i> | <i>19</i> |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 19 |
| RESULTADOS | 21 |
| DISCUSIÓN | 25 |
| CONCLUSIONES | 27 |
| PROPUESTAS | 28 |
| ANEXO | 29 |
| REACTIVOS | 29 |
| <i>Solución de lisis de células rojas (RCLB)</i> | <i>29</i> |
| <i>Amortiguador para lisis de células blancas (WCLB)</i> | <i>29</i> |
| <i>Fenol Saturado equilibrado</i> | <i>29</i> |
| <i>Fenol/cloroformo</i> | <i>30</i> |
| <i>Cloroformo/alcohol isoamílico</i> | <i>30</i> |
| <i>TE</i> | <i>30</i> |
| <i>Mezcla de amplificación</i> | <i>30</i> |
| <i>TAE 50X</i> | <i>30</i> |
| <i>TAE 1X</i> | <i>31</i> |
| <i>Denhart 50X</i> | <i>31</i> |
| <i>SSPE 20X</i> | <i>31</i> |
| <i>Solución de prehibridación e hibridación</i> | <i>31</i> |
| <i>Amortiguador 0</i> | <i>31</i> |
| <i>Amortiguador 1</i> | <i>32</i> |
| <i>Amortiguador 2</i> | <i>32</i> |
| <i>Amortiguador 3</i> | <i>32</i> |
| <i>Anticuerpo</i> | <i>32</i> |
| <i>CSPD</i> | <i>32</i> |
| <i>Marcaje de oligonucleótidos con ddUTP-digoxigenina y desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)</i> | <i>32</i> |
| CALCULOS | 32 |
| GLOSARIO | 34 |
| BIBLIOGRAFÍA | 36 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| CUADRO 1. INICIADORES PARA LA IMPLIFICACIÓN DE LOS ALELOS HLA-DRB1..... | 12 |
| CUADRO 2. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES SECUENCIA ESPECÍFICOS DE DRB1..... | 12 |
| CUADRO 3. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES HLA..... | 12 |
| CUADRO 4. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DRB1-DR1..... | 12 |
| CUADRO 5. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DRB1-DR2..... | 12 |
| CUADRO 6. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DRB1-DR4 GR..... | 12 |
| CUADRO 7. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DRB1-DR4 VR..... | 12 |
| CUADRO 8. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DE LOS ALELOS DRB1 ASOCIADOS AL DR52 GR..... | 12 |
| CUADRO 9. SONDAS EMPLEADAS EN LA TIPIFICACIÓN DE LOS ALELOS DRB1 ASOCIADOS AL DR52 VR..... | 12 |
| CUADRO 10. SONDAS UTILIZADAS EN LA TIPIFICACIÓN DE ALELOS DRB1-DR8 ASOCIADOS AL DR52 GR..... | 12 |
| CUADRO 11. FRECUENCIAS GENICAS DE LOS ALELOS DRB1 EN LA NP SIMPLE..... | 12 |
| CUADRO 12. HLA EN LA SUCEPTIBILIDAD/PROTECCIÓN EN LA NP SIMPLE..... | 12 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. EXPRESIÓN DEL COMPLEJO PÉPTIDO-MOLÉCULAS DEL MHC CLASE I SOBRE LA SUPERFICIE DE LINFOCITOS T..... | 12 |
| FIGURA 2. MAPA DEL COMPLEJO HLA..... | 12 |
| FIGURA 3. LOCALIZACIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL MHC CLASE II, EN EL BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 6..... | 12 |
| FIGURA 4. AMPLIFICACIÓN DEL ALELO DRB1 *04 DE MUESTRAS DE DNA DE TESTIGOS POSITIVOS Y NEGATIVOS..... | 12 |
| FIGURA 5. AMPLIFICACIÓN DEL ALELO DRB1*0301 DE TESTIGOS Y PACIENTES (NP4-NP19)..... | 12 |
| FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE LOS ALELOS HLA-DRB1 EN LA NP SIMPLE..... | 12 |

1 RESUMEN

Se han descrito alrededor de 50 genes HLA. Este complejo genético induce y regula a la respuesta inmunológica y discrimina lo propio de lo extraño. Incluye regiones que codifican para los bien conocidos antígenos de superficie HLA-clase I y -clase II que presentan antígenos a las células T CD8+ y CD4+, respectivamente. La región de clase II, abarca aproximadamente 1,000 KB con la subregión DP localizada en el extremo centromérico, la DR en el telomérico y la de DQ en el centro. La subregión DR está formada por 10 loci, el DRA poco polimórfico y 9 loci DRB, del DRB1 al DRB9, de los que sólo los loci DRB1, 3, 4 y 5 se expresan y los demás son pseudogenes. Los genes DR y DQ están muy cerca uno del otro, por lo que se encuentran en desequilibrio de enlace; el DP está más alejado de ellos, por lo que el desequilibrio de enlace es débil o no existe. Los genes clase II sólo se expresan en algunas células como las **Células Presentadoras de Antígenos (CPAs)** (macrófagos, monocitos, células de Langerhans, células dendríticas), en los linfocitos B, Linfocitos T activados, células epiteliales del timo, células endoteliales y en algunas células tumorales. Oficialmente, existen descritos 21 antígenos de DR, 9 de DQ y 6 de DP, pero el micropolimorfismo demuestra que hay por lo menos 450 variantes moleculares.

Por lo cual el objetivo del presente trabajo está enfocado en el estudio de la frecuencia de los alelos de la región HLA-DRB1 con el propósito de conocer la contribución de estos en la susceptibilidad a la poliposis nasal (NP) simple, no asociada con sensibilidad al Acido Acetil Salicílico (AAS) y al asma. Se analizó la participación de cada alelo, tipificando el locus DRB1 de clase II, utilizando dos métodos: PCR y PCR-SSOPs; a 169 testigos y a 38 pacientes.

Los genes clase II son relevantes en la expresión de la NP simple. DRB1*0301 es un gen de susceptibilidad con una fracción etiológica (FE)=17.63% y un razón de momios (RM)=2.737. Un hallazgo relevante es que existe un gen dentro de este locus, que proporciona resistencia a este padecimiento, DRB1*1602 con una RM=0.229 y una fracción preventiva (FP)=8.56%. Por esos motivos, se propone que un sujeto que tenga el alelo DRB1*0301 en su composición genética, tiene susceptibilidad a desarrollar la NP simple, mientras que si se posee el gen DRB1*1602 tendrá protección a dicho padecimiento.

Con los resultados de este trabajo y el de los otros trabajos revisados más adelante, se demuestra la contribución genética del gen DRB1 en la NP simple, lo que ha permitido concluir que este gen participa parcialmente en el desarrollo de la poliposis nasal, apoyando la hipótesis de que es una enfermedad poligénica, en la que aún no se conocen todos los genes clase I y clase II y otros genes candidatos que participan en el desarrollo de la enfermedad.

1 INTRODUCCIÓN

La poliposis nasal afecta a los senos paranasales y por extensión a las fosas nasales. Anatómicamente la piedra angular de esta enfermedad la constituye la afectación del etmoides, hueso impar que pertenece a la base del cráneo y al macizo facial. En su evolución la poliposis afectará a los senos maxilares, frontales y esfenoidales. La prevalencia de la poliposis nasal es del 2 al 5 % de la población general. La poliposis suele manifestarse por encima de los 40 años ⁽¹⁾. La poliposis nasal es excepcional en los menores de 10 años, debiéndose pensar a esta edad en una fibrosis quística. Puede asociarse o ser una manifestación concomitante de otras enfermedades de la nariz, de los senos paranasales o enfermedades sistémicas. Con más frecuencia de la esperada en la población general se asocia al asma ⁽²⁾. Cuando además de asma existe intolerancia al Acido Acetil Salicílico (AAS) se conoce como tríada de Widal o de Samter, conociéndose actualmente como tríada de Widal o enfermedad de Samter, autor que en los años 60 retomó la descripción de Widal y la estudió clínicamente ^(3, 4).

Respecto a la etiología de los pólipos nasales aún existe discusión. Se han citado sobre todo la alergia, pero también la presencia de hongos saprofitos ^(5, 6, 7) y una base genética debido a una discreta agregación familiar de la poliposis nasal ^(8, 9), factores adicionales como la contaminación ambiental, alteraciones del flujo aerodinámico del aire, disfunciones del sistema nervioso autónomo, infecciones, alteraciones ciliares de las células de la mucosa nasal, alteración del metabolismo y la homeostasis celular y factores de edema local. Los conocimientos actuales apoyan la hipótesis de una patogenia multifactorial en la que los pólipos se originan a partir de una base inflamatoria crónica persistente condicionada por un microambiente local. La base fisiopatológica se encuentra en la inflamación difusa de la mucosa de las fosas nasales y senos paranasales. Los pólipos nasales contienen una gran cantidad de células inflamatorias, sobre todo eosinófilos y mastocitos. Estas células, además de las células estructurales, como fibroblastos y células epiteliales, liberan moléculas que actúan como mediadores inflamatorios. Entre los mediadores inflamatorios destaca: la histamina, un gran número de citocinas, quimiocinas, factores de transcripción y eicosanoides ^(10, 11). La presencia de eosinófilos activados por muchos de estos mediadores inflamatorios, es una de las características más destacadas de los pólipos nasales y parece ser la responsable principal de la inflamación crónica persistente en la poliposis nasal.

Los síntomas de inicio suelen ser la sensación de ocupación nasal y la hiposmia. A medida que la enfermedad progresa van apareciendo otros síntomas como una obstrucción respiratoria nasal evidente y un agravamiento de la hiposmia. Los pacientes suelen presentar desde un principio síntomas semejantes a los de la rinitis.

En los adultos la asociación de poliposis intranasal con sensación subjetiva de ocupación de ambas fosas nasales, hiposmia o anosmia junto a la visualización de los pólipos mediante la exploración otorrinolaringológica suelen ser

suficientes para el diagnóstico. Es útil realizar una evaluación estricta de la alergia para descartar factores agravantes, así como una tomografía computarizada (TC) para evaluar la extensión sinusal de la enfermedad. El tratamiento de elección en la poliposis nasal son los corticoides, sobre todo el tratamiento corticoideo intranasal. El uso de corticoides intranasales tras la cirugía reduce también el número de recurrencias. En los últimos años se ha discutido intensamente el tratamiento médico corticoideo intranasal y ocasionalmente, el sistémico como único tratamiento. Estudios recientes hipotetizan que la inflamación en los pólipos nasales puede representar un tipo de resistencia adquirida al tratamiento con glucocorticoides. Esto ocurre especialmente en los pacientes afectados de asma con o sin intolerancia al AAS. Se ha sugerido también un papel importante de la ciclooxigenasa (Cox), enzima responsable de sintetizar diversas prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA).

Diferentes publicaciones hacen referencia a la asociación familiar, destacando los estudios de gemelos idénticos que desarrollan pólipos a la misma edad aun sin vivir juntos ⁽⁸⁾, o en otros casos uno desarrolla pólipos y el otro asma ⁽⁹⁾. Según esta sospecha genética la poliposis nasal es una enfermedad poligénica en la que hay evidencia de la participación de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) ^(12, 13).

El MHC en el humano se conoce como Complejo HLA (del inglés: Human Leucocyte Antigens). Se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y abarca aproximadamente 4,000 Kb. Se han descrito alrededor de 50 genes HLA. Este complejo genético induce y regula la respuesta inmunológica y discrimina lo propio de lo extraño ^(14, 15). Incluye regiones que codifican para los bien conocidos antígenos de superficie HLA-clase I y -clase II que presentan antígenos a las células T CD8+ y CD4+, respectivamente. Entre las regiones de clase I y clase II del MHC del humano está la región de clase III que incluye genes para algunos de los componentes del sistema del complemento ^(16, 17), centromérico a la región de clase I hay un grupo de genes que codifican tres proteínas inflamatorias: factor de necrosis tumoral (TNF)- α , linfotoxina α (LTA) y linfotoxina β (LTB) ⁽¹⁸⁻²¹⁾.

Las moléculas MHC clase I son glicoproteínas de membrana presentes en casi todas las células nucleadas. Están formadas por una glicoproteína de 45 KDa llamada cadena pesada o α unida no covalentemente a la β_2 -microglobulina (β_2 -m), que es la cadena ligera de 12 KDa. La cadena α tiene 3 dominios: α -1, α -2 y α -3, una región transmembranal TM y una región citoplásmica CY. La región de unión al péptido se encuentra en los dominios α -1 y α -2, que forman la porción superior de la molécula clase I, donde radica todo el polimorfismo. El dominio α -3 y la β_2 -m forman parte de la porción extracelular de la molécula y tienen una estructura muy similar a la de la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuyos genes evolucionaron del mismo gen ancestral, al igual que los genes clase II, los del receptor de las células T (TCR), los de las moléculas CD2, CD3, CD4, CD8 y el gen de la molécula de adhesión neural (N-CAM). Los dominios de unión al péptido no pertenecen a esta familia, pero su estructura secundaria tiene homología con la HSP-70 ^(14, 15).

La región de clase I está formada por 17 genes, de los cuales sólo se transcriben 6 productos, los demás son pseudogenes. Codifica para los antígenos clásicos HLA-A, -B y -C, que se llaman así por el papel central que juegan en la unión y presentación de péptidos a las células T CD8+, son muy polimórficos y se encuentran ampliamente distribuidos sobre las membranas de todas las células nucleadas, con excepción de los eritrocitos y los espermatozoides. Su densidad es particularmente elevada en los linfocitos T y B. Existen otros genes clase I no clásicos que gobiernan la síntesis de antígenos de diferenciación: la molécula HLA-G se expresa sobre membranas del trofoblasto y en la interfase materno-fetal. Las HLA-E y -F son intracelulares. Los genes clase I no clásicos difieren de los clásicos en que no son polimórficos y se expresan en el período embrionario interviniendo en la maduración y en el mantenimiento intrauterino del feto. Los genes HLA-X y -H se transcriben pero no son funcionales ^(14, 15).

La cristalografía de las moléculas clase I permitió un mejor entendimiento de su función ⁽²²⁾. Inmediatamente se reconoció la importancia del sitio de unión al péptido, localizado en los dominios α -1 y α -2, así como su significado en la interacción con el TCR. Los péptidos que se unen a las moléculas clase I se generan por degradación del antígeno en el citosol de la célula presentadora de antígeno (CPA) por la vía proteolítica, mediada por los proteasomas. Estos son complejos protéicos multicatenarios que contienen 15 a 20 subunidades. Hay dos subgrupos de proteasomas, denominados LMP1 y LMP7, codificados en la región de clase II y cuya función es generar péptidos de un tamaño y especificidad adecuados para asociarse con las moléculas clase I. Estos péptidos son transportados al retículo endoplásmico, mediante transportadores de péptidos antigénicos (TAP), que son heterodímeros codificados por los genes TAP1 y TAP2, también ubicados en clase II. Dentro del retículo endoplásmico, los TAP se asocian con la cadena α de la molécula clase I que ya se encuentra unida a la β_2m ⁽²³⁾. Se requiere de la molécula completa para unir al péptido y para darle estabilidad. La asociación se lleva a cabo por una proteína residente en el retículo endoplásmico llamada calnexina, que se disocia una vez que el complejo se ha formado. En este momento se une a TAP y recibe al péptido para formar el complejo clase I-péptido que se exporta eficientemente a la superficie de las células. La molécula clase I que no se carga con un péptido se dirige a un subcompartimiento del retículo endoplásmico para su degradación. La mayoría de los péptidos que se unen a clase I derivan de las proteínas endógenas y son de 8 a 10 residuos de aminoácidos. Los extremos amino y carboxilo del péptido se insertan dentro del nicho formado por los dominios polimórficos. Una vez que se forma el complejo clase I-péptido, es presentado al TCR del precursor de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) que inducen la expresión del receptor de IL-2 del linfocito T para su proliferación y diferenciación hacia CTLs maduros, que matan selectivamente a las células que expresan el complejo clase I-péptido ⁽²⁴⁾. En la figura 1 se esquematiza el proceso de la expresión de complejos péptido-molécula de clase I ⁽²⁵⁾.

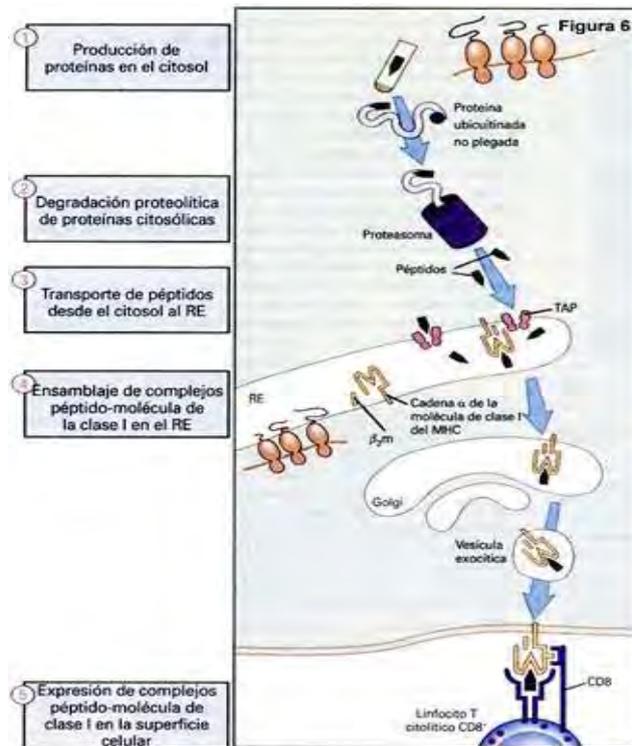


Figura 1. Expresión del complejo péptido-moléculas del MHC clase I sobre la superficie de linfocitos T. Tomado de <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>

Además de una vía citosólica, hay evidencias de la existencia de vías no citosólicas para la presentación de antígenos exógenos por moléculas MHC clase I en los macrófagos. La presentación de ovalbúmina asociada a bacterias (en forma de una proteína de fusión) por clase I no es inhibida por brefeldina A, sugiriendo una vía no citosólica. Otro ejemplo es la presentación por clase I de antígenos virales asociados con detritos celulares. La presentación de estos antígenos no se inhibe ni por brefeldina, ni por una mutación en el transportador TAP. Se piensa que en estos casos los péptidos son generados por proteólisis en el compartimiento endocítico. Sin embargo, no está completamente resuelto si estos péptidos se unen a las moléculas clase I y puede estar operando más de un mecanismo. También se ha sugerido que los péptidos pueden unirse a clase I dentro de vesículas, ya que el de ovalbúmina (SIINFEKL) es presentado por clase I cuando es conducido a los fagosomas sobre un soporte inerte. Tales datos implican que las moléculas clase I viajan dentro de compartimientos vesiculares ⁽²⁶⁾.

En general, las moléculas clase I no se encuentran en las vesículas endocíticas de la mayoría de las células, pero pueden entrar a este compartimiento en los fagocitos por diferentes vías. Algunos estudios indican que las moléculas de la superficie celular entran en los fagosomas y son internalizadas de la membrana plasmática durante la fagocitosis y sugieren que las moléculas clase I recién sintetizadas también pueden ser transportadas a esas vesículas. Además, en los macrófagos pueden reciclarse constitutivamente entre la superficie celular y el compartimiento endocítico. La endocitosis de clase I ocurre también en las células T y esto debe considerarse para algunos ejemplos de presentación de

antígenos exógenos. Finalmente, la cadena invariable, comúnmente usada en el transporte de clase II, puede asociarse con algunas moléculas clase I recién sintetizadas y dirigir su transporte dentro de las vesículas endocíticas. En todos estos casos, la mayoría de las moléculas clase I que entran en el compartimiento endocítico probablemente ya están ocupadas con péptidos. No obstante, es posible que haya suficiente número de moléculas clase I vacías para unir péptidos o que el bajo pH en las vesículas pueda disociarlos y generar moléculas vacías ⁽²⁶⁾.

Los estudios iniciales que demostraron que los fagocitos podían presentar antígenos exógenos sobre moléculas clase I se llevaron a cabo *in vitro* y la pregunta clave fue si esta vía podía operar bajo condiciones fisiológicas. La relevancia de la vía *in vivo* se demostró con la inyección de ovalbúmina soluble en ratones que resultaba en su presentación por macrófagos sobre moléculas clase I. También se encontró que los mismos antígenos particulados presentados por fagocitos *in vitro* estimulan respuestas de CTLs cuando se inyectan *in vivo*. Sin embargo, no hay datos que indiquen cuál de estas vías opera *in vivo*, pero la vía citosólica puede tener una ventaja sobre los mecanismos que requieren unión de péptidos a moléculas clase I vacías sobre la superficie o en las vesículas endocíticas. Un papel importante de esta vía exógena podría ser proporcionar vigilancia para patógenos que sobreviven en los fagosomas. Esto permitiría a los CTLs destruir las células crónicamente infectadas y por lo tanto purgar al hospedero de los patógenos intracelulares. Además, las células T CD8+ secretan citocinas como el interferón, que estimulan a los macrófagos para matar a los microbios. En apoyo a este concepto, se demostró que las respuestas de CTLs generadas contra patógenos vacuolares como *Mycobacterium*, *Plasmodium* y *Leishmania* confieren protección ⁽²⁶⁾.

La región HLA-D ahora se conoce como región de clase II y abarca aproximadamente 1,000 KB con la subregión DP localizada en el extremo centromérico, la DR en el telomérico y la de DQ en el centro. La subregión DR está formada por 10 loci, El DRA poco polimórfico y 9 loci DRB, del DRB1 al DRB9, de los que sólo los loci DRB1, 3, 4 y 5 se expresan y los demás son pseudogenes⁽²⁷⁾. En la figura 2 se esquematiza el mapa del complejo HLA ⁽²⁸⁾.

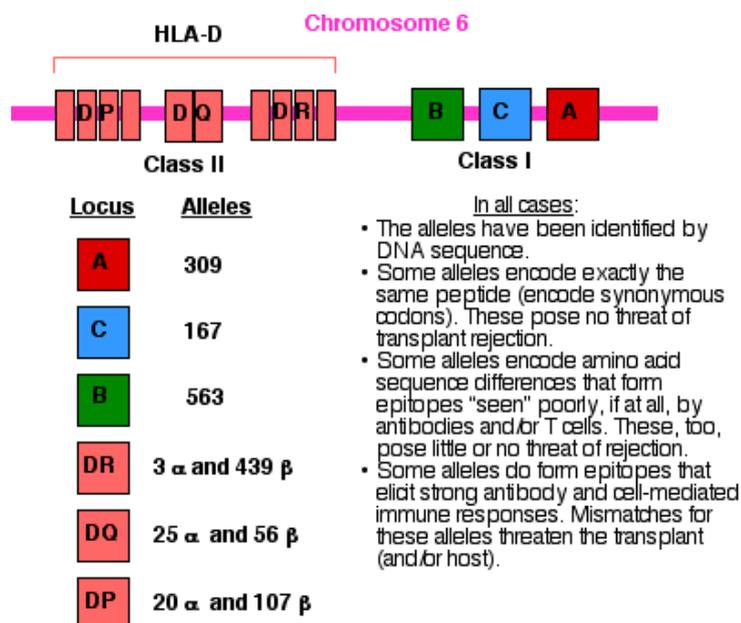


Figura 2. Mapa del complejo HLA. Tomado de http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/H/HLA_loci.gif.

Las moléculas clase II son codificadas por dos genes, uno para la cadena α y el otro para la cadena β y el producto de ambos genes forman una glicoproteína heterodimérica que se encuentra unida a la membrana plasmática. La cadena α , o pesada, tiene 33-35 KDa y la cadena β , o ligera, es de 27-29 KDa y se encuentran unidas en forma no covalente. La cadena α tiene dos dominios α -1 y α -2, una región transmembranal (TM) y una región citoplasmática (CY). La cadena β está compuesta por los dominios β -1 y β -2, la región TM y la CY. El péptido se une a los dominios α -1 y β -1, que se encuentran en la porción más externa de la molécula clase II, formando el nicho de unión del péptido. La mayor parte del polimorfismo se encuentra en el dominio β -1 de las moléculas clase II, aunque en DQ hay cierta variabilidad en el dominio α -1 y mucho menos en $DP\alpha$. Los dominios α -2 y β -2 tienen una estructura bastante similar a la de las inmunoglobulinas y pertenecen a esta superfamilia. Existe una cadena invariable (Ii) de 33 KDa, que es el tercer componente de los antígenos clase II y el gen que la codifica está localizado en el cromosoma 5⁽²⁹⁾.

Los genes DR y DQ están muy cerca uno del otro, por lo que se encuentran en desequilibrio de enlace; el DP está más alejado de ellos, por lo que el desequilibrio de enlace es débil o no existe. Los genes clase II sólo se expresan en algunas células como las CPAs (macrófagos, monocitos, células de Langerhans, células dendríticas), en los linfocitos B, Linfocitos T activados, células epiteliales del timo, células endoteliales y en algunas células tumorales⁽¹⁴⁾. La variabilidad de los genes clase II es verdaderamente extraordinaria. Oficialmente, existen descritos 21 antígenos de DR, 9 de DQ y 6 de DP, pero el micropolimorfismo demuestra que hay por lo menos 450 variantes moleculares⁽³⁰⁾.

Las moléculas clase II, cuya cristalografía se dio a conocer en 1993 ⁽³¹⁾, unen péptidos generados por la degradación de proteínas por la vía endocítica, internalizando antígenos de la superficie a los endosomas primarios. De ahí, pasa a los endosomas secundarios y finalmente a los fagolisosomas. La catepsina A y B de los lisosomas son las proteasas generadoras de péptidos. El complejo clase II-péptido se forma en el compartimiento prelisosomal, en donde se acumulan las moléculas clase II recién sintetizadas. Las cadenas α y β se ensamblan en el retículo endoplásmico ayudadas por la calnexina y se asocian inmediatamente con la cadena invariante (Ii), la que evita que el sitio de unión al péptido se ocupe. Este sitio tiene una considerable variación alélica y acomoda péptidos de 13-25 residuos de aminoácidos ⁽³²⁾. Tres heterodímeros clase II forman un complejo nonamérico con la cadena Ii trimérica, dirigiéndose así a la vía endocítica. La mayoría de las cadenas Ii son removidas por proteólisis, dependiente de actividades de catepsina B y D, antes de que las moléculas clase II se acumulen en los compartimientos pre-lisosómicos ricos en clase II. Las moléculas HLA-DM, que también se acumulan en los compartimientos ricos en clase II, catalizan la remoción dependiente de pH bajo del péptido llamado CLIP (del inglés: **C**lass II associated **I**nvariant **P**eptide), que cubre el sitio de unión a péptidos de clase II y que se deriva del corte de la cadena Ii. El CLIP mantiene a las moléculas clase II en una conformación relativamente inestable, por lo cual no es receptiva para los péptidos antigénicos. El CLIP es eliminado por HLA-DM quien aumenta la unión a clase II de otros péptidos generados en la vía endocítica, que pueden inducir el movimiento de las moléculas clase II a una conformación altamente estable. El mecanismo por el cual las moléculas clase II son liberadas del compartimiento pre-lisosómico para la expresión en la superficie no está completamente claro. La microscopía electrónica sugiere que, en algunos casos, el compartimiento que lleva a las moléculas clase II puede fusionarse a la superficie celular, dejando a las moléculas ocupadas por péptidos ^(24, 33).

Por costumbre, el MHC es dividido en tres regiones contiguas que permiten la localización de genes que comparten características. En el cromosoma 6p más centromérica está la región de clase II, que contiene los 17 genes y pseudogenes HLA conocidos ⁽²⁷⁾. Enseguida se encuentra la región de clase III, que codifica algunos de los componentes del sistema del complemento. Hacia la parte telomérica de la región de clase III está la región de clase I, que codifica más de 18 genes y pseudogenes. Recientemente, varios genes involucrados en la inflamación se han identificado en la parte central del MHC, en el extremo telomérico de la región de clase III. Este grupo de genes puede jugar un papel importante en varios aspectos de tensión, inflamación o infección. Se ha sugerido que a esta región se le llame región de clase IV ⁽³⁴⁾, dentro de la que encontramos a los genes de la familia del TNF (TNF- α , LTA y LTB), así como a los genes B144 (D6S49E), 1C7 (D6S2570E), AIL-1, I κ B-like (NFKBIL1) y SKI2W, colocados en el extremo telomérico de la región de clase III ⁽³⁵⁾ muy cerca de los genes clase I más centroméricos. En la figura 3 se esquematiza la localización y organización del MHC, en el brazo corto del cromosoma 6 humano ⁽³⁶⁾.

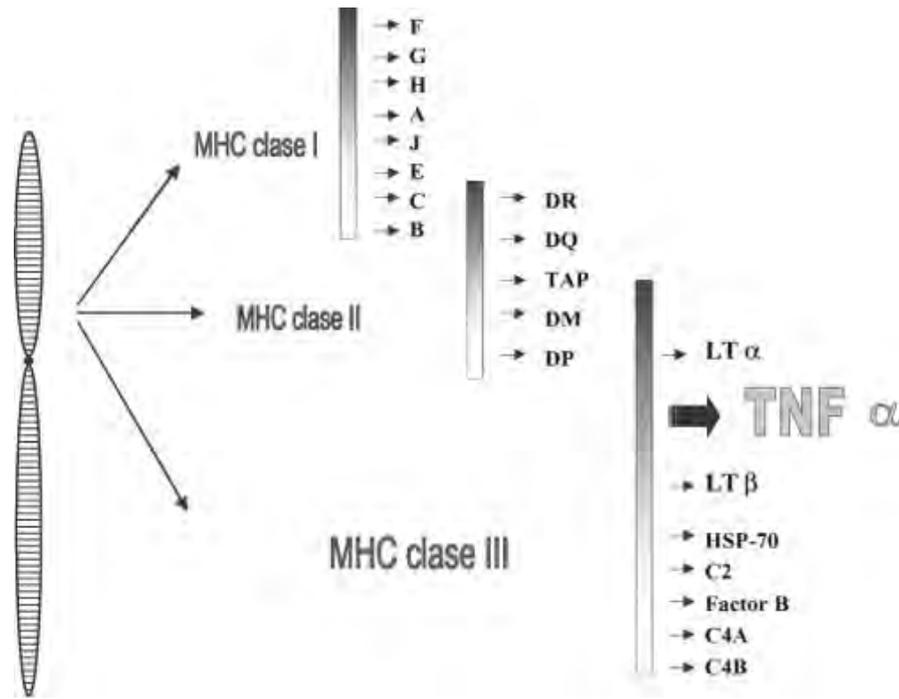


Figura 3. Localización y organización del MHC clase II, en el brazo corto del cromosoma 6 humano. Tomado de Llanos y cols, 2005 ⁽³⁶⁾.

2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La poliposis nasal es aparentemente una enfermedad poligénica, en la que se desconoce cuales podrían ser los genes candidatos que participan en el desarrollo de la enfermedad. Los estudios de la contribución del HLA en la poliposis nasal muestran segregación familiar en gemelos idénticos, en los que se observa el desarrollo de pólipos a la misma edad aun sin vivir juntos ⁽⁸⁾ o la aparición de pólipos en uno y de asma en el otro ⁽⁹⁾. La evidencia de la participación de los genes del HLA clase II proviene también de estudios de casos y controles en los que se ha encontrado una asociación significativa con el haplotipo HLA-DR7-DQA1*0201-DQB1*0202, en pacientes con poliposis nasal, asma e intolerancia al Ácido Acetil Salicílico (AAS) ⁽¹²⁾. Sin embargo, no se encontró asociación con la poliposis nasal simple o con la poliposis nasal y asma. Se ha descrito también asociación de los genes HLA clase I con poliposis nasal, particularmente del HLA-A1-B8 con intolerancia al AAS y HLA-A74 con poliposis nasal simple ⁽³⁷⁾.

Por otro lado, se ha demostrado la expresión de moléculas HLA-DR e ICAM-1 en las células epiteliales de individuos con poliposis nasal, lo que sugiere la participación de las moléculas HLA clase II en la respuesta a probables antígenos que desencadenan una inflamación crónica de la vías respiratorias altas ⁽¹³⁾.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La frecuencia del alelo de la región HLA-DRB1 estará incrementada en los pacientes con poliposis nasal?

2 JUSTIFICACIÓN

La poliposis nasal es una enfermedad frecuente en las afecciones otorrinolaringológicas, que se presenta a menudo asociada a otros padecimientos, como el asma, la intolerancia al AAS, o ambas. Sin embargo, los casos en los cuales se presenta la poliposis nasal simple son más escasos. Por otro lado, aparentemente es una enfermedad poligénica y se desconoce cuales pueden ser los genes candidatos que están participando en el desarrollo de la misma. Los estudios del HLA sugieren una asociación, tanto de los genes de clase I, como de los de clase II con la poliposis nasal con intolerancia al AAS. No obstante, la presencia de moléculas DR en las células epiteliales indica que las moléculas de clase II son las que están directamente involucradas en los mecanismos de respuesta inmunológica que se están llevando a cabo en el epitelio nasal, por lo cual podría suponerse que las asociaciones descritas con los haplotipos HLA clase I pudieran ser efecto del desequilibrio de ligamiento con los alelos de clase II, más que con los de clase I. Además, no se ha encontrado una asociación con la poliposis nasal simple, probablemente debido al limitado número de pacientes incluido en los estudios anteriormente descritos, ya que los pacientes con poliposis nasal, asma e intolerancia al AAS son más frecuentes y constituyen un número más representativo de los mismos. Por estas razones, sería importante determinar si existe una asociación de la poliposis nasal simple y alguno de los alelos de los genes del HLA-clase II en pacientes mexicanos, particularmente con el gen DRB1.

1 OBJETIVO

Evaluar la existencia de susceptibilidad genética para desarrollar poliposis nasal asociada al incremento de algún alelo del gen HLA-DRB1 en pacientes con poliposis nasal simple.

1 HIPÓTESIS

Si el gen HLA-DRB1 está participando en el desarrollo de la poliposis nasal simple, entonces se esperaría que la frecuencia de algún alelo DRB1 estuviera incrementada en el grupo de pacientes.

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.1 Pacientes con poliposis nasal

Se incluyeron 38 individuos con poliposis nasal simple, diagnosticados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

1.1.2 Testigos

Se incluyeron 169 sujetos aparentemente sanos, mestizos mexicanos del altiplano de México, ya que son una muestra representativa de la población mexicana general.

1.1.3 Extracción de DNA

Se tomaron de cada sujeto, 20 ml de sangre periférica, con EDTA como anticoagulante. Se obtuvo el paquete de leucocitos por centrifugación a 1,600 xg a 4⁰C, durante 15 min. Los eritrocitos se eliminaron con dos o tres lavados de 5 mM de MgCl₂, centrifugando cada vez a 1,600 xg a 4⁰C durante 15 min, hasta la obtención del paquete de leucocitos libre de eritrocitos. El paquete se trató con: 50 mM NaCl; 10 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.2% SDS; 300 µg/ml proteinasa K y se incubó durante 12 h a 53⁰C⁽³⁸⁾.

El DNA se extrajo dos veces con fenol equilibrado (v/v), dos con fenol/cloroformo /alcohol isoamílico (24:1) (v/v) y dos con cloroformo alcohol isoamílico (24:1) (v/v). En cada extracción se agitó suavemente la mezcla hasta su homogeneización y se centrifugó durante 15 min a 4⁰C. El DNA se precipitó con 100 mM final de NaCl y un volumen de isopropanol. Una vez precipitado, se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0).

1.2 TIPIFICACIÓN DE LOS ALELOS DRB1⁵⁵

1.2.1 Cuantificación del DNA

El DNA extraído de cada sujeto se diluyó 1:100 y se leyó a 240 nm, 260 nm y 280 nm. La concentración del DNA se calculó tomando la lectura a 260 nm X la dilución X 50 (coeficiente de extinción molar del DNA). La pureza se verificó haciendo las relaciones de las lecturas a 260/240 y 260/280, que deben estar entre 1.7 y 2.0⁽³⁸⁾.

1.2.2 Amplificación del DNA

Para cada individuo se amplificó el segundo exón del locus DRB1 para los diferentes subgrupos: DRB1-DR1, DRB1-DR2, DRB1-DR3, DRB1-DR4, DRB1-DR5, DRB1-DR6, DRB1-DR7, DRB1-DR8, DRB1-DR9, DRB1-DR10^(39, 40).

Los iniciadores utilizados para las diferentes amplificaciones son los diseñados por el XII Taller Internacional de Histocompatibilidad y del trabajo de Olerup y Zetterquist y se enlistan en los cuadros 1 y 2. Las muestras se amplificaron en un termociclador Hybaid Express, usando 30 ciclos. Las condiciones para cada loci se describen en el cuadro 3.

1.2.3 Verificación de la amplificación

Se tomaron 10 µl del producto de cada amplificación y se les añadió 5 µl de colorante para corrimiento (1mL glicerol al 100%; 1mL rojo de cresol en agua destilada). Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% (5g de agarosa, 250mL de TAE 1X) con TAE y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, durante 60 min a 90 voltios. El gel se observó con luz UV (312 nm) y se fotodocumentó para su registro.

1.3 TIPIFICACIÓN CON OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS POR EL MÉTODO DE SONDAS ESPECÍFICAS DE SECUENCIA (SSOPs)

1.3.1 Sembrado de las muestras

Previamente en un formato de dot-blot, se determinó la localización de cada muestra en cada membrana. En cajas de polipropileno con formato de 96 pozos, se colocaron 400µl de H₂O estéril en cada pozo; enseguida se agregó en cada pozo 40 µl de cada una de las muestras positivas de los alelos a tipificar por este método. Esto es para preparar 4 membranas en formato de dot-blot. Se cortaron membranas de nylon positivamente cargadas de 12 cm X 8 cm, las cuales se marcaron con ayuda de un lápiz de grafito. Para aplicar las muestras se utilizó un aparato de dot-blot (Bio-Rad). Previamente, se permearon las membranas con SSPE 10X. El DNA de las membranas se desnaturizó con 0.4 M NaOH durante 10 min y se neutralizó con 10X SSPE durante 10 min. El DNA se fijó a la membrana durante 2 min. con luz UV (312 nm).

1.3.2 Marcaje de los SSOs

Se colocaron 100 pmoles de cada SSOP en tubos de 1.5 ml, se añadió 1 nmol de ddUTP-digoxigenina, 5 mM cloruro de cobalto, amortiguador para desoxitransferasa terminal (TdT), 37 U de TdT (Boehringer) y agua destilada para un volumen final de 20 µl. El SSOP marcado se llevará a un volumen de 100 µl de TE (1pmol/ml). En el cuadro 4 se muestran las sondas que se emplearon para la tipificación ^(24, 26).

1.3.3 Prehibridación e hibridación de las membranas

Cada membrana se colocó en un tubo de polipropileno de 15 ml, se añadieron 5 ml de la mezcla de prehibridación y se incubaron durante 14 h a 42^oC. Se añadieron 20 picomoles del SSOP marcado con ddUTP-digoxigenina. Las membranas se incubaron durante 14 h a 42^oC.

CUADRO 1. INICIADORES PARA LA IMPLIFICACIÓN DE LOS ALELOS HLA-DRB1

| NOMBRE | INICIADORES | | ALELOS | TAMAÑO DE LA BANDA |
|---------------|--------------------|--------|---|---------------------------|
| R1.1 | R5´01 | R3´15 | DRB1*0101, *0102, *0104 | 196 bp |
| R1.2 | R5´01 | R3´10 | DRB1*0103 | 197 bp |
| R2/15 | R5´02 | R3´01 | DRB1*1501, *1502, *1503 (Falta *1504) | 197 bp |
| R2/16 | R5´02 | R3´02 | DRB*1601, *1602, *1603, *1605, *1606 (Falta *1604) | 213 bp |
| R3 | R5´03 | R3´03 | DRB1*03011, *0302,*0303 (Falta *0304 y *03012) | 151 bp |
| R3/17 | R5´06 | R3´048 | DRB1*03011, *03012 | 217 bp |
| R3/18 | R5´03 | R3´047 | DRB1*0302, *1302, *1305, *1402, *1403, *1409, *1413, *1109 | 189 bp |
| R4 | R5´04 | R3´04 | DRB1*0401-*0417 y *1410 (*0418?, *0419?) | 263 bp |
| R7 | R5´07 | R3´079 | DRB1*0701 | 189 bp |
| R8.1 | R5´08 | R3´045 | DRB1*0801, *0803, *0805, *0806, *0810 | 161 bp |
| R8.2 | R5´08 | R3´18 | DRB1*0802, *0804, *0809 | 163 bp |
| R8.3 | R5´08 | R3´047 | DRB1*0801, *08021, *08022, *08031, *08032, *0805, *0807, *0808, *0809, *0811 | 250 bp |
| R9 | R5´09 | R3´091 | DRB1*09011, *09012 | 200 bp |
| R10 | R5´10 | R3´047 | DRB1*1001 | 204 bp |
| R5/11 | R5´05 | R3´06 | DRB1*1101-*1113 | 176 bp |
| R5/12.1 | R5´08 | R3´08 | DRB1*1201, *1202 (Falta *1203) | 248 bp |
| R5/12.2 | R5´08 | R3´02 | DRB1*1201, *1202 (Falta *1203) | 314 bp |
| R6/13.1 | R5´03 | R3´10 | DRB1*1301, *1302 | 130 bp |
| R6/13.2 | R5´05 | R3´045 | DRB1*1303, *1304, *1312, *1413 | 171 bp |
| R6/13.3 | R5´03 | R3´17 | DRB1*1305, *1307, *1109 | 130 bp |
| R6/14.11 | R5´05 | R3´11 | DRB1*1401, *1405, *1407, *1408, *1414 | 224 bp |
| R6/14.12 | R5´08 | R3´11 | DRB1*1404, *1411 | 215 bp |
| R6/14.2 | R5´03 | R3´12 | DRB1*1305, *1306, *1402, *1406, *1409, *1307, *1109, *1403, *1412, *1413, *1417 | 140 bp |
| R6/14.3 | R5´03 | R3´05 | DRB1*1403, *1412 | 152 bp |
| R/14.4 | R5´04 | R3´19 | DRB1*1410 | 172 bp |

Tomado del XII Taller Internacional de Histocompatibilidad y de Olerup y Zetterquist ⁽⁴¹⁾.

CUADRO 2. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES SECUENCIA ESPECÍFICOS DE DRB1

| INICIADOR | SECUENCIA |
|-----------|--------------------------------------|
| R5'01 | 5'-TTG TGG CAG CTT AAG TTT GAA T-3' |
| R5'02 | 5'-TCC TGT GGC AGC CTA AGA G-3' |
| R5'03 | 5'-TAC TTC CAT AAC CAG GAG GAG A-3' |
| R5'04 | 5'-GTT TCT TGG AGC AGG TTA AAC A-3' |
| R5'05 | 5'-GTT TCT TGG AGT ACT CTA CGT C-3' |
| R5'06 | 5'-GAC GGA GCG GGT GCG GTA-3' |
| R5'07 | 5'-CCT GTG GCA GGG TAA GTA TA-3' |
| R5'08 | 5'-AGT ACT CTA CGG GTG AGT GTT-3' |
| R5'09 | 5'-GTT TCT TGA AGC AGG ATA AGT TT-3' |
| R5'10 | 5'-CGG TTG CTG GAA AGA CGC G-3' |
| R5'11 | 5'-CGG GTG CGG TTC CTG GAG-3' |
| R3'01 | 5'-CCG CGC CTG CTC CAG GAT-3' |
| R3'02 | 5'-AGG TGT CCA CCG CGG CG-3' |
| R3'03 | 5'-TGC AGT AGT TGT CCA CCC G-3' |
| R3'04 | 5'-CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT-3' |
| R3'05 | 5'-CTG CAG TAG GTG TCC ACC AG-3' |
| R3'06 | 5'-CTG GCT GTT CCA GTA CTC CT-3' |
| R3'079 | 5'-CCC GTA GTT GTG TCT GCA CAC-3' |
| R3'08 | 5'-CAC TGT GAA GCT CTC CAC AG-3' |
| R3'091 | 5'-CCG CCT CCG CTC CAG GAA-3' |
| R3'10 | 5'-CCC GCT CGT CTT CCA GGA T-3' |
| R3'11 | 5'-TCT GCA ATA GGT GTC CAC CT-3' |
| R3'12 | 5'-TCC ACC GCG GCC CGC C-3' |
| R3'15 | 5'-CCG CCT CTG CTC CAG GAG-3' |
| R3'17 | 5'-CCC GCC TGT CTT CCA GGA A-3' |
| R3'18 | 5'-GCT GTT CCA GTA CTC GGC AT-3' |
| R3'19 | 5'-CTG TTC CAG TGC TCC GCA G-3' |
| R3'20 | 5'-CT GTT CCA GGA CTC GGC GA-3' |
| R3'21 | 5'-AC CTC GGC CCG CCT CCG-3' |
| R3'22 | 5'-AC CGC GGC CCG CCT CTG-3' |
| R3'23 | 5'-T CTG GCT GTT CCA GTA CTC G-3' |
| R3'041-1 | 5'-GTC CAC CGC GGC CCG CTT C-3' |
| R3'042 | 5'-CGC GGC CCG CTC GTC T-3' |
| R3'043 | 5'-TGC AGT AGG TGT CCA CCT-3' |
| R3'044 | 5'-CTG CAG TAG GTG TCC ACC G-3' |
| R3'045 | 5'-TGT TCC AGT ACT CGG CGC T-3' |
| R3'046 | 5'-CGC TGT CGA AGC GCA CGG-3' |
| R3'047 | 5'-CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC-3' |
| R3'048 | 5'-CTG CAC TGT GAA GCT CTC CA-3' |
| R3'0412 | 5'-GTC CAC CGC GGC CCG CCT G-3' |
| R3'0416 | 5'-CTG GCT GTT CCA GTA CTG-3' |

Tomado del XII Taller Internacional de Histocompatibilidad y de Olerup y Zetterquist ⁽⁴¹⁾.

CUADRO 3. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DRB1

| INICIADOR | Desnaturalización | Alineación | Extensión | MgCl₂ Final |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| R5'01 | 96 ⁰ C/ 1 min | 60 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 Mm |
| R5'02 | 96 ⁰ C/ 1 min | 60 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 Mm |
| R5'03 | 96 ⁰ C/ 1 min | 64 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 Mm |
| R5'04 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R5'05 | 96 ⁰ C/ 1 min | 64 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R5'06 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R5'07 | 96 ⁰ C/ 1 min | 60 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R5'08 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R5'09 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R5'10 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R5'11 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'01 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'02 | 96 ⁰ C/ 1 min | 60 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'03 | 96 ⁰ C/ 1 min | 60 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'04 | 96 ⁰ C/ 1 min | 64 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'05 | 96 ⁰ C/ 1 min | 64 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'06 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'079 | 96 ⁰ C/ 1 min | 66 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'08 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'091 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'10 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'11 | 96 ⁰ C/ 1 min | 60 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'12 | 96 ⁰ C/ 1 min | 60 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'15 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'17 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'18 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'19 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'20 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'21 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'22 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'23 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'041-1 | 96 ⁰ C/ 1 min | 68 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'042 | 96 ⁰ C/ 1 min | 58 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'043 | 96 ⁰ C/ 1 min | 56 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'044 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'045 | 96 ⁰ C/ 1 min | 60 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'046 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'047 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'048 | 96 ⁰ C/ 1 min | 62 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'0412 | 96 ⁰ C/ 1 min | 70 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |
| R3'0416 | 96 ⁰ C/ 1 min | 56 ⁰ C/ 1 min | 72 ⁰ C/ 1 min | 1.5 mM |

Tomado del XII Taller Internacional de Histocompatibilidad y de Olerup y Zetterquist ⁽⁴¹⁾.

1.4 SONDAS RECOMENDADAS POR EL XII TALLER INTERNACIONAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD PARA LA TIPIFICACION DE LOS GENES CLASE II (24).

CUADRO 4. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DRB1-DR1

| <i>No. de Sonda</i> | <i>Tm^oC</i> | <i>Alelo(s)</i> |
|---------------------|------------------------|----------------------|
| 5701 | 58 | *0101,0102,0103,0104 |
| 7001 | 64 | *101,0102,0104 |
| 7007 | 56 | *0103 |
| 7032W | 56 | *0401 |
| 8601 | 58 | *0101,0103 |
| 8602 | 58 | *0102 |
| 8603 | 58 | *0104 |

CUADRO 5. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DRB1-DR2

| <i>No. de sonda</i> | <i>Tm^oC</i> | <i>Alelo (s)</i> |
|---------------------|------------------------|---|
| 2817 | 56 | *1503 |
| 3702 | 58 | *1501, 15021, 15022, 1503, 1504, 1505,*1601, 1602, 1603, 1604, 1605, 1606 |
| 4701W | 66 | *1601, 1602 ,1603 ,1604 ,1605, 1606 |
| 4702W | 66 | *1501, 15021, 15022, 1503, 1504, 1505 |
| 5701W | 58 | *15022 |
| 5706 | 58 | *1501, 15021, 1503, 1504, 1505, 1601, *1602, 1603, 1604, 1605, 1606 |
| 7002 | 56 | *1601, 1603, 1604 |
| 7003 | 58 | *1602 |
| 7010W | 58 | *1605 |
| 7011 | 60 | *1501, 15021, 15022, 1503 |
| 7013W | 66 | *1603, 1606 |
| 7014W | 66 | *1601, 1602, 1605 |
| 7019W | 56 | *1504, 1601, 1603, 1604 |
| 7030 | 62 | *1604 |
| 7037W | 60 | *1504 |
| 8603 | 58 | *1501, 1503, 1504, 1505 |

CUADRO 6. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DRB1-DR4 GR

| <i>No. de sonda</i> | <i>Tm^oC</i> | <i>Alelo (s)</i> |
|---------------------|------------------------|---|
| 3704 | 54 | *0401, 0405, 0407, 0408, 0409, 0414, 0416, 0417 |
| 3715 | 56 | *0419, 0420, 0421 |
| 5701 | 58 | *0401, 0407, 0408, 0414, 0419, 0420, 0421 |
| 5702 | 60 | *0405, 0409, 0417 |
| 5703 | 56 | *1122 |
| 5704 | 62 | ----- |
| 5710W | 58 | *0416 |
| 7001 | 62 | *0405,0407,0408,0417,0419,0420 |
| 7005 | 64 | *0401,0409,0416,0421 |
| 7006 | 64 | *0407,0417,0420 |
| 7007 | 56 | *0414 |
| 7009 | 66 | ----- |
| 7010W | 58 | ----- |
| 7012 | 66 | *0405,0408,0419 |
| 8601 | 56 | *0401,0405,0407,0408,0409,0414,0416,0417,0419, 0420, 04021, 1122 |
| 8603 | 56 | ----- |

CUADRO 7. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DRB1-DR4 VR

| <i>No. de sonda</i> | <i>Tm^o C</i> | <i>Alelo (s)</i> |
|---------------------|-------------------------|--|
| 3407 | 54 | *0402, 0403, 0404, 0406, 0410, 0411, 0412, 0413, 0415, 0416 |
| 3715 | 56 | *0406 |
| 5701 | 58 | *0402, 0403, 0404, 0406, 0413, 0416, 0422 |
| 5702 | 60 | *0410, 0411, 0 412 |
| 5703 | 56 | *0415 |
| 5704 | 62 | *1410 |
| 5710W | 58 | ----- |
| 7001 | 62 | *0403, 0404, 0406, 0410, 0411 |
| 7002 | 56 | *0415 |
| 7005 | 64 | *0413, 0422 |
| 7007 | 56 | *0402 |
| 7009 | 66 | *1410 |
| 7010W | 58 | *0412, 0418 |
| 7012 | 66 | *0404, 0410 |
| 8601 | 56 | ----- |
| 8603 | 56 | *0402, 0403, 0404, 0406, 0410, 0411, 0412, 0413, 0415, 0418, 0422, 1410 |

CUADRO 8. SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DE LOS ALELOS DRB1 ASOCIADOS AL DR52 GR

| <i>No de sonda</i> | <i>Tm^oC</i> | <i>Alelo (s)</i> |
|--------------------|------------------------|--|
| 1003 | 58 | *0302, 01011, 11012, 11081, 11082, 1109, 1110, 1111, 1112, 11302, 1303, 1305, 1307, 1312, 1313, 1402, 1403, 1407, 1409, 1413, 1414 |
| 2809W | 56 | *0302, 1402, 1413 |
| 3703 | 58 | *0302, 1302, 1109, 1305, 1402, 1403, 1409, 1413 |
| 3713 | 58 | *1101, 1105, 1108, 1111, 0801, 08021, 08022, 08032, 0805, 0807, 0808, 08011, 1303, 1307, 1312, 1313 |
| 5701 | 58 | *0302, 08021, 08022, 0809, 1302, 1305, 1307, 1402, 1403, 1409, 1414 |
| 5702 | 60 | *0801, 0803, 0805, 1303, 1312, 1313, 1413 |
| 5703 | 60 | *1101,1105,1108,1109,1110,1111,1112 |
| 7002 | 56 | *0801, 0802, 0805, 0807, 0809, 0811, 1101, 1105, 1109, 1110, 1112, 1305, 1307 |
| 7003 | 58 | *11081,11082,1403 |
| 7004 | 60 | *0302 |
| 7007 | 56 | *1302 |
| 7010W | 58 | *08031, 08032, 1312, 1313 |
| 7012 | 66 | *1402, 1409, 1413 |
| 7013 | 64 | *1303 |
| 7016 | 62 | *11011, 11012, 1105, 11081, 11082, 1109, 1110, 1112, 1305, 1307, 1312, 1313 |
| 7018 | 56 | *1302, 1303, 1312, 1313, 08031, 08032 |

CUADRO 9. SONDAS EMPLEADAS EN LA TIPIFICACIÓN DE LOS ALELOS DRB1 ASOCIADOS AL DR52 VR

| <i>No. de Sonda</i> | <i>Tm^oC</i> | <i>Alelo (s)</i> |
|---------------------|------------------------|---|
| 1005W | 56 | *0804, 0806, 0810, 1201, 1202, 1203, 1404, 1411, 1415 |
| 2807 | 56 | *03011, 03012, 0304 |
| 2809 | 56 | *0303, 1406, 1412 |
| 3702W | 58 | *0304 |
| 3705W | 62 | *1201, 1202, 1203 |
| 3712 | 60 | *1113, 1308, 1401, 1404, 1405, 1408, 1411, 1415, 1416 |
| 5702 | 60 | *0806, 0810, 1304 |
| 5703 | 60 | *1102, 1103, 1104, 1106, 1107, 1113, 1411 |
| 5704 | 62 | *1401, 1404, 1416 |
| 7007 | 56 | *1102, 1301, 1304, 1308, 1416 |
| 7010 | 58 | *0810, 1201, 1203, 1306 |
| 7012 | 66 | *1406, 1417 |
| 7016 | 62 | *11041, 11042, 1106, 1203, 1306, 1311, 0805 |
| 7032 | 54 | *03012 |
| 8602 | 58 | *1106, 1201, 1202 |

CUADRO 10. SONDAS UTILIZADAS EN LA TIPIFICACIÓN DE ALELOS DRB1-DR8 ASOCIADOS AL DR52 GR

| <i>No. de sonda</i> | <i>Tm⁰C</i> | <i>Alelo (s)</i> |
|---------------------|------------------------|---|
| 3713 | 54 | *0802 |
| 5701 | 60 | *0802, 0809 |
| 5702 | 60 | *0801, 0803, 0805 |
| 5704 | 62 | *0808, 1407 |
| 7002 | 60 | *0801, 0802, 0805, 0807, 0808, 0809, 0811 |
| 7010 | 58 | *0803 |
| 7016 | 58 | *1101, 1105, 1108, 1110, 1112, 1305, 1307, 1312, 1313, 0805 |

1.4.1 Quimioluminiscencia

Las membranas se lavaron dos veces con 2X SSPE, 1% SDS a temperatura ambiente durante 10 min, dos veces a la Tm de cada SSOP [Tm= 2 (A+T)+4 (G+C)] con 6X SSPE, 1% SDS durante 15 min. Posteriormente se lavaron con AMORTIGUADOR 1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.3% Tween 20) dos veces durante 5 min a temperatura ambiente. Se incubaron con reactivo bloqueador (Roche) (AMORTIGUADOR 2) durante 30 min a temperatura ambiente. Después se incubaron con Fab anti-digoxigenina (Roche) 1:10,000 en AMORTIGUADOR 2 durante 60 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con amortiguador 1, se incubaron 5 min a temperatura ambiente con AMORTIGUADOR 3 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂). Finalmente se incubaron 5 min a temperatura ambiente con CSPD (Roche) diluido 1:500 en amortiguador 3. Se eliminó el exceso de CSPD de las membranas y se colocaron en bolsas de plástico transparente, se sellaron con calor, se incubaron a 37⁰C durante 15 min y se expusieron a placas de rayos X durante 15 min en un cuarto oscuro. Se llevaron a cabo varias exposiciones para el análisis correcto de los resultados (5 min, 10, min, 15 min, 20 min) ⁽²⁶⁾.

1.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las Frecuencias Alélicas (FA) por conteo directo para obtener la proporción de sujetos, del total estudiados, que son portadores de un determinado alelo. La FA se obtiene en porcentaje.

Para evaluar la significancia estadística de la desviación de un marcador genético en la enfermedad con respecto a los individuos sanos, cuando un alelo se encuentra significativamente elevado o disminuido, se emplea la X² usando la corrección de Yates. Esta corrección hace la prueba más estricta, pues este sistema genético es extraordinariamente polimórfico y cualquier alelo podría mostrar significancia debida al azar. Una vez obtenida la X² se busca la probabilidad (p) con un intervalo de confianza del 95% y un grado de libertad. El nivel de límite de significancia estadística es de p<0.05. Para hacer aun más estricta esta evaluación se utiliza la corrección de Bonferonni, multiplicando la p por el número de comparaciones hechas para cada locus, es decir por el

número de alelos que se evaluaron. A este valor se le denomina p corregida (pc) ⁽⁴³⁾.

$$\chi^2 Y = \frac{(ad-bc-N/2)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

a = número de pacientes positivos para el alelo
 b = número de pacientes negativos para el alelo
 c = número de testigos positivos para el alelo
 d = número de testigos negativos para el alelo

El Razón de Momios (RM) es una estimación de la intensidad de la asociación e indica cuantas veces más riesgo de desarrollar la enfermedad tiene un individuo portador del alelo en cuestión, cuando éste está significativamente incrementado en los pacientes, sugiriendo la presencia de un alelo de susceptibilidad. Se calcula según la fórmula de Haldane ^(43,44).

$$RM = \frac{(2a+1)(2d+1)}{(2b+1)(2c+1)}$$

La Fracción Etiológica (FE) es una medida relativa que indica cuanto de la asociación se debe al marcador que se halla significativamente aumentado. Mientras más se acerca el valor a la unidad, más se debe la enfermedad al marcador. Se calcula como sigue ⁽⁴⁵⁾:

$$FE = \left(\frac{RR-1}{RR} \right) \times \left(\frac{a}{a+b} \right)$$

La Fracción Preventiva (FP) es también una medida relativa, que indica cuanto de la protección se debe al marcador, en los casos en los que se encuentra un alelo significativamente disminuido y que por lo tanto significa protección ⁽⁴⁵⁾. Se calcula como sigue:

$$hp = \frac{a}{a+b} \qquad FP = \frac{(1-RR)hp}{RR(1-hp) + hp}$$

1 RESULTADOS

Las 169 muestras de DNA de los testigos y las 38 muestras de pacientes con NP simple, se amplificaron con los diferentes pares de iniciadores que se muestran en el cuadro 1. En la figura 4 se observan las bandas obtenidas de algunas de las amplificaciones del grupo DRB1*04 con un tamaño esperado de 263 bp. En la figura 5 se muestran los resultados de algunos individuos positivos para el alelo DRB1*0301.

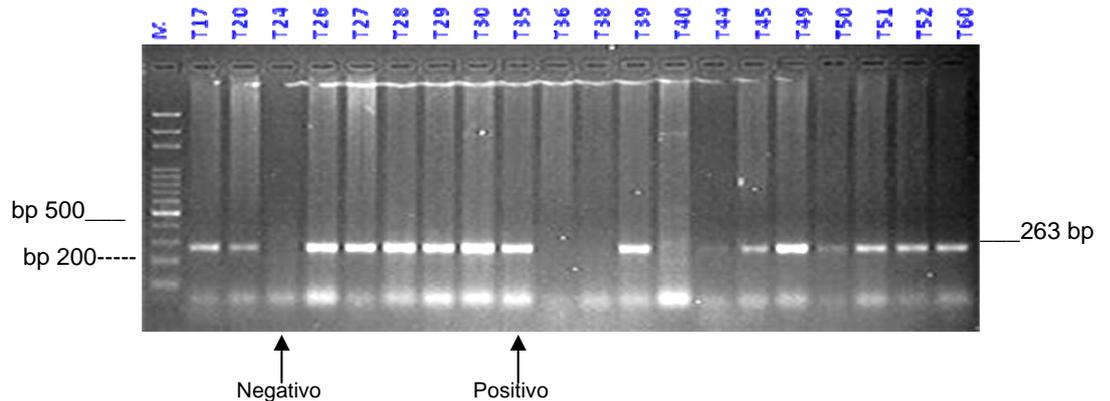


Figura 4. Amplificación del alelo DRB1*04 de muestras de DNA de testigos positivos y negativos.

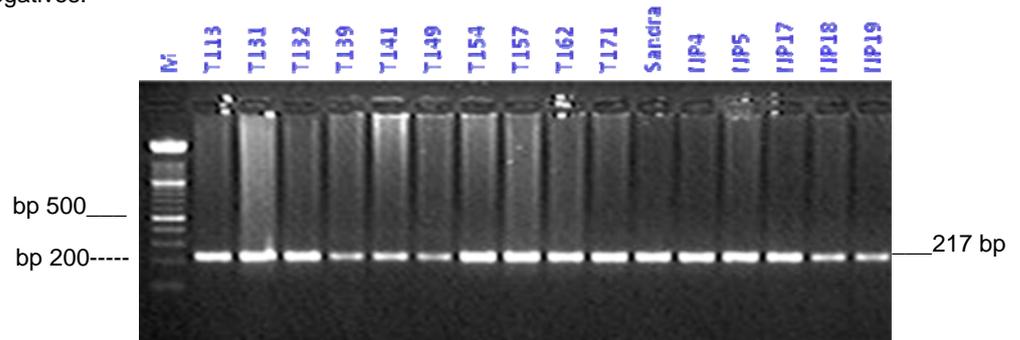


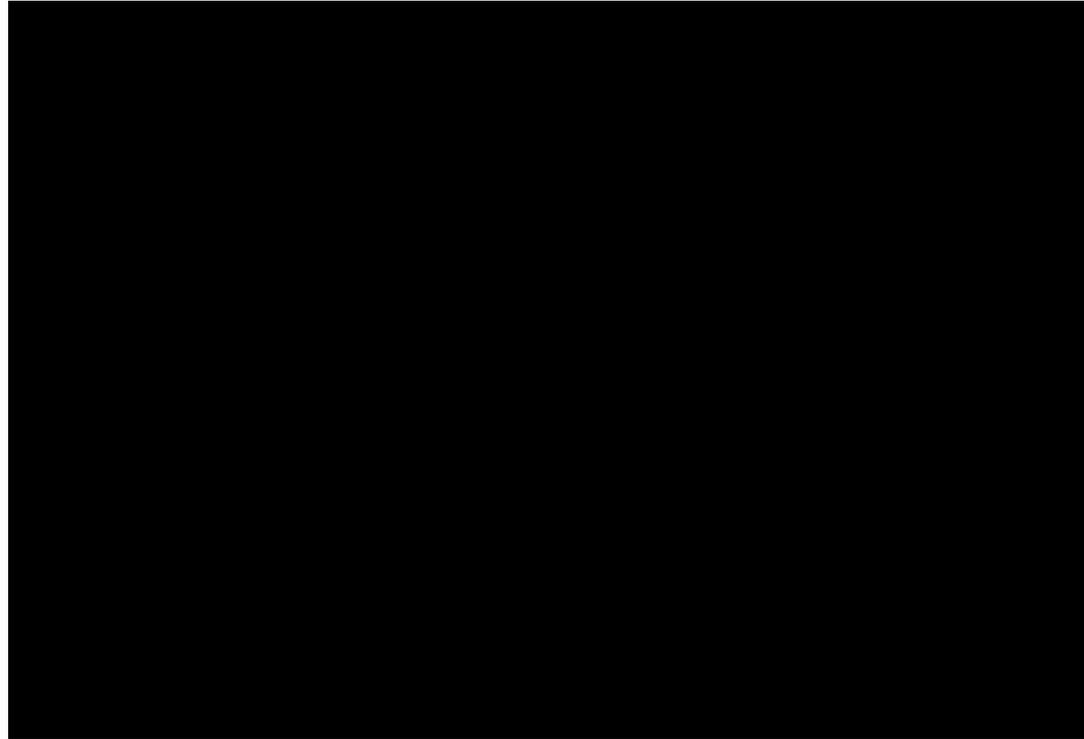
Figura 5. Amplificación del alelo DRB1*0301 de testigos y pacientes (NP4–NP19).

Después de las amplificaciones específicas, se asignaron los alelos correctos a cada uno de los 169 testigos y 36 pacientes para los genes DRB1-DR1, DRB1-DR2, DRB1-DR3, DRB1-DR4, DRB1-DR5, DRB1-DR6, DRB1-DR7, DRB1-DR8, DRB1-DR9, DRB1-DR10. En el cuadro 11 y en la figura 6 se muestran las FA de los pacientes con NP y de los testigos, observándose una FA mayor del alelo DRB1*0301 en enfermos con una RM=2.737 y una FE=17.63%, mientras que en el alelo DRB1*1602 presenta una FA menor con una RM=0.229 y una FP=8.56%. En el cuadro 12, se observan los resultados del análisis estadístico de los alelos significativamente desviados. Aunque los valores de la probabilidad (p) fueron significativos, cuando se corrigió la p multiplicando por el número de alelos (pc), se perdió la significancia estadística. Adicionalmente, se encontró que los alelos DRB1*0407 y DRB1*0802 se encuentran en mayor frecuencia en testigos, mientras que el DRB1*0301 y DRB1*0802 están en mayor proporción en los pacientes.

CUADRO 11. FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL GEN DRB1 EN LA NP SIMPLE.

| ALELOS DRB1 | TESTIGOS | | PACIENTES | |
|-------------|----------|--------|-----------|--------|
| | N=169 | FA (%) | N=36 | FA (%) |
| *0101 | 3 | 0.89 | 1 | 1.39 |
| *0102 | 7 | 2.07 | 5 | 6.94 |
| *0103 | 2 | 0.59 | 0 | 0.00 |
| *0301 | 22 | 6.51 | 10 | 13.89 |
| *0302 | 2 | 0.59 | 3 | 4.17 |
| *0401 | 2 | 0.59 | 0 | 0.00 |
| *0402 | 9 | 2.66 | 3 | 4.17 |
| *0403 | 12 | 3.55 | 0 | 0.00 |
| *0404 | 18 | 5.33 | 7 | 9.72 |
| *0405 | 4 | 1.18 | 3 | 4.17 |
| *0407 | 48 | 14.20 | 7 | 9.72 |
| *0411 | 10 | 2.96 | 0 | 0.00 |
| *0701 | 4 | 1.18 | 2 | 2.78 |
| *0801 | 3 | 0.89 | 0 | 0.00 |
| *0802 | 63 | 18.64 | 11 | 15.28 |
| *1001 | 4 | 1.18 | 0 | 0.00 |
| *1101 | 7 | 2.07 | 2 | 2.78 |
| *1102 | 1 | 0.30 | 1 | 1.39 |
| *1104 | 5 | 1.48 | 0 | 0.00 |
| *1201 | 7 | 2.07 | 0 | 0.00 |
| *1301 | 14 | 4.14 | 0 | 0.00 |
| *1302 | 7 | 2.07 | 4 | 5.56 |
| *1303 | 2 | 0.59 | 1 | 1.39 |
| *1401 | 3 | 0.89 | 0 | 0.00 |
| *1402 | 6 | 1.78 | 1 | 1.39 |
| *1403 | 1 | 0.30 | 0 | 0.00 |
| *1406 | 28 | 8.28 | 5 | 6.94 |
| *1501 | 10 | 2.96 | 2 | 2.78 |
| *1502 | 3 | 0.89 | 0 | 0.00 |
| *1503 | 2 | 0.59 | 1 | 1.39 |
| *1601 | 3 | 0.89 | 2 | 2.78 |
| *1602 | 26 | 7.69 | 1 | 1.39 |

FRECUENCIA ALELICA (%)



ALELO DRB1

FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE LOS ALELOS HLA-DRB1 EN LA NP SIMPLE.

CUADRO 12. HLA EN LA SUCEPTIBILIDAD/PROTECCIÓN EN LA NP SIMPLE

| ALELO | $\chi^2 Y$ | <i>P</i> | <i>Pc</i> | RM (95% IC) | FE | FP |
|---------------|------------|----------|-----------|-------------|---------|--------|
| DRB1*0301 (S) | 4.31 | 0.037 | 0.75 | 2.737() | 0.17628 | -0.214 |
| DRB1*1602 (P) | 5.30 | 0.021 | 0.42 | 0.229() | -0.0936 | 0.0856 |

1 DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra que existen 2 alelos de DRB1 que están asociados con la presencia de la NP simple en una población mestiza mexicana, en pacientes que no presentan sensibilidad al AAS, ni asma. Es importante enfatizar que la evidencia de la participación de los genes del HLA clase II proviene también de estudios de casos y controles en los que se encontró una asociación significativa con el haplotipo HLA-DR7-DQA1*0201-DQB1*0202, en pacientes con NP, asma e intolerancia al AAS ⁽¹²⁾. Sin embargo, no se demostró asociación con la NP simple o con la poliposis nasal y asma. Se ha descrito también asociación de los genes HLA clase I con NP, particularmente del HLA-A1-B8 con intolerancia al AAS y HLA-A74 con NP ⁽³⁷⁾; lo cual demuestra la contribución genética de diferentes genes en dicho padecimiento, lo que apoya la teoría de que la poliposis nasal es una enfermedad poligénica, en la que aún no se definen todos los genes que participan en el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, cabe señalar que se ha demostrado la expresión de moléculas HLA-DR e ICAM-1 en las células epiteliales de individuos con poliposis nasal, lo que sugiere una participación directa de las moléculas HLA clase II en la respuesta a probables antígenos que desencadenan una inflamación crónica de la vías respiratorias altas ⁽¹³⁾. En un trabajo previo, Fajardo-Dolci y cols, encontraron en estos mismos pacientes una asociación significativa con los alelos DQA1*0201 y DQB1*0201 ⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, tomando los resultados obtenidos en el presente estudio y los obtenidos en el trabajo de Fajardo-Dolci y cols, se observa que aparentemente el alelo DRB1*0301 no se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los dos alelos antes mencionados. En los trabajos hasta ahora publicados en humanos, sólo se ha descrito la asociación de alelos HLA clase II con la triada de Widal, o con NP y asma, pero no existen trabajos en los que se analice la asociación de los alelos HLA clase II con poliposis nasal simple, probablemente por el limitado número de pacientes con esta característica. No obstante, en este estudio logró reunirse una muestra, aunque limitada, suficientemente representativa para el análisis de asociación con el HLA-DRB1.

El alelo que se asocia con susceptibilidad a la NP simple es el DRB1*0301 con una FE= 17.63% y una RM=2.737, indicando que los individuos que presenten este alelo tienen 2.7 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad y que este alelo contribuye en un 17.6% a la enfermedad. Existe un hallazgo relevante, durante el estudio de la susceptibilidad a la NP simple del gen DRB1, no solo se encontró un alelo de susceptibilidad a la enfermedad, sino que también uno de protección, el alelo DRB1*1602 con una FP= 8.56% y una RM=0.229. Cabe destacar que los alelos *0407 y *0802 son los más frecuentes en la población mexicana, pero con ninguno se encontró alguna asociación, ya que su FA es mayor a la de los otros alelos; la FA de cada uno es de 14.20% y 18.64% respectivamente, en testigos.

De acuerdo a las publicaciones que hacen referencia a la asociación familiar, destacando que los estudios de gemelos idénticos que desarrollan pólipos a la misma edad sin vivir juntos ⁽⁸⁾ y con los resultados obtenidos en el presente

trabajo, se puede comprobar que sí existe una participación de los antígenos HLA. Sin embargo, dado que la asociación no es del 100%, esto apoya el aspecto poligénico de la enfermedad, además de las evidencias de los otros trabajos mencionados.

Por otro lado, como bien sabemos las enfermedades hereditarias son un conjunto de enfermedades genéticas caracterizadas por transmitirse de padres a hijos y que se puede o no manifestar en algún momento de sus vidas. Por lo cual podría considerarse a la NP simple como una enfermedad hereditaria y poligénica, ya que hay una discreta agregación familiar; en la que probablemente existen otros factores que pueden desencadenar el desarrollo de la enfermedad, por lo que se consideraría multifactorial, además de que todavía no se ha dilucidado si la etiología de los pólipos nasales, es debida a una alergia, a la presencia de hongos saprofitos, o a otras causas aún desconocidas.

1 CONCLUSIONES

Existe cierta participación del gen DRB1 en la NP simple, ya que:

1. Se postula que la formación de pólipos puede ser debido a que la molécula HLA-DRB1*0301 pueda presentar péptidos que inducen una respuesta no protectora ante un supuesto agente patógeno que infecte el epitelio nasal, o bien que estos péptidos provocan una reacción inflamatoria exacerbada, produciendo la enfermedad.
2. Hay cierta tendencia a que la susceptibilidad esté determinada por el alelo DRB1*0301, ya que presentó una $p=0.037$, pero no se mantuvo la significancia estadística cuando se calculó la pc .
3. De la misma manera, el alelo DRB1*1602 tiene una $p=0.021$ que se pierde en la corrección. Sin embargo este alelo presenta una tendencia hacia la protección.
4. El riesgo de desarrollar NP simple es de 2.737 veces más alto para un individuo que tenga en su composición genética el alelo DRB1*0301, que para el que no lo presente.

1 PROPUESTAS

- 1.** Se sugiere investigar cuales son las células que participan en la reacción inflamatoria de los sujetos que presentan NP simple, mediante inmunohistoquímica.
- 2.** Se propone estudiar las interleucinas presentes en esta patología para corroborar o determinar la participación de las subpoblaciones de linfocitos en la NP simple.
- 3.** Así mismo se propone estudiar los polimorfismos de las interleucinas para correlacionar estos estudios para determinar si existe una relación con la NP.

ANEXO

REACTIVOS

Solución de lisis de células rojas (RCLB)

MgCl₂ 5 mM
Guardar la solución a temperatura ambiente

Amortiguador para lisis de células blancas (WCLB)

Tris-HCl pH 7.6 10 mM
EDTA pH 8.0 10 mM
NaCl 50 mM
SDS 0.2%
Proteinasa K (sigma) 300 µg/ml
Esterilizar por filtración
Guardar la solución en alícuotas de 15 ml a -20°C

Fenol Saturado equilibrado

Antes de usar el fenol debe equilibrarse a pH mayor de 7.8, porque el DNA puede quedarse dentro de fase orgánica (fenólica) si el pH es ácido.

1. El fenol bidestilado se debe almacenar a -20°C. Cuando se prepara el fenol equilibrado se funde a 68°C (Baño maría). Al fenol líquido se adiciona 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%. La 8-hidroxiquinolina es una antioxidante, inhibidor parcial de RNAsa y es quelante débil de iones.
2. Añadir un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 a temperatura ambiente, agitar con una barra magnética durante 15 min, permitir que se separen las dos fases, eliminando la fase superior (acuosa).
3. Adicionar a la fase inferior (fenólica) un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0. Agitar de igual forma que en el punto 2, remover la fase acuosa.
4. Repetir el paso 3, hasta que la fase fenólica alcance un pH mayor de 7.8 (aproximadamente pH 8.0).
5. Después de que el fenol está en equilibrio, remover la fase acuosa y adicionar 1 volumen de Tris-HCl 0.1M, pH 8.0 conteniendo 0.2% de 2-mercaptoetanol.
6. Guardar en un frasco ámbar a 4°C por períodos mayores de 1 mes.

Fenol/cloroformo

Para preparar el fenol/cloroformo debe eliminarse la fase superior del fenol saturado o tomar sólo la fase fenólica y mezclar cantidades iguales de fenol saturado y cloroformo/alcohol isoamílico. Mezclar, dejar a 4⁰C toda la noche. Usar la fase inferior.

Cloroformo/alcohol isoamílico

Tomar 24 partes de cloroformo puro y añadir una parte de alcohol isoamílico, mezclar y guardar a 4⁰C

TE

| | |
|-----------------|-------|
| Tris-HCl pH 8.0 | 10 mM |
| EDTA pH 8.0 | 1 mM |

Mezcla de amplificación

| | |
|----------------------------|--|
| dNTP`s (2 mM c/u) | 5.0 µL |
| Amortiguador 10X | 5.0 µL |
| MgCl ₂ (25mM) | 4.0 µL |
| Iniciador A (25 ρmoles/µl) | La cantidad de cada iniciador dependerá de la absorbancia obtenida (ver calculo en el apartado de anexos – cálculos) |
| Iniciador B (25 ρmoles/µl) | |
| Taq Polimerasa (2 U/µl) | 0.3 µL |
| DNA (100 ηg/µl) | 2.0 µL |
| H ₂ Odd | La cantidad se calcula cuando se tiene ya la cantidad de iniciador A y B. |
| | <hr style="width: 10%; margin: 0 auto;"/> 50.0 µL |

Adicionar 2 gotas de aceite mineral.

Amplificar en un termociclador (Hybaid) en el programa adecuado.

TAE 50X

| | |
|-----------------------|---------|
| Tris-Base (sigma) | 242.0 g |
| Ácido acético glacial | 57.1 mL |
| EDTA 0.25 M pH 8.0 | 200 mL |
| Agua cbp | 1 litro |

TAE 1X

| | |
|----------|---------|
| TAE 50X | 20 mL |
| Agua cbp | 1 litro |

Denhart 50X

| | |
|-------------------------------|----|
| Albúmina sérica bovina pH 7.5 | 1% |
| Polivinilpirrolidona 40 | 1% |
| Ficoll 400 | 1% |

SSPE 20X

| | |
|-----------------------------|-------|
| NaCl | 3.0 M |
| Fosfato de sodio monobásico | 0.2 M |
| EDTA (pH 8.0) | 20 mM |

Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 10 M en 800 ml de agua destilada y después aforar a un litro.

Solución de prehibridación e hibridación

| | |
|----------------------------|-----------|
| SSPE | 6 X |
| Denhart | 5 X |
| ssDNA | 100 µg/ml |
| Lauroil sarcosina de sodio | 0.1% |
| SDS | 0.02% |
| Agua destilada cbp | |

Amortiguador 0

| | |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl pH 7.6 | 0.1 mM |
| NaCl | 0.15 M |

Ajustar a pH de 7.5 con NaOH
Esterilizar en autoclave.

Amortiguador 1

Amortiguador 0 + Tween 20 al 0.3%

Amortiguador 2

Reactivo "blocking" (Boehringer) al 1% solubilizado en amortiguador 0. Se recomienda una solución madre al 10% en amortiguador 0, distribuir en alícuotas de 100 ml y guardarlas a -20°C hasta su uso. La solución de trabajo se prepara diluyendo 100 ml de la solución madre a 1L con amortiguador 0.

Amortiguador 3

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl pH 9.5 | 100 mM |
| NaCl | 100 mM |
| MgCl ₂ | 50 mM |

Anticuerpo

Anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (0.75 U/μl). La dilución de trabajo es 1:10,000 en amortiguador 2

CSPD

La dilución de trabajo es 1:500 en amortiguador 3

Marcaje de oligonucleótidos con ddUTP-digoxigenina y desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)

Para marcar 100 picomoles de oligonucleótido:

| | |
|---------------------------------|----------------|
| "Tailing buffer" 5X | 4.0 μl |
| CoCl ₂ (25 mM) | 4.0 μl |
| ddUTP-Dig (1 ηmol/μl) | 1.0 μl |
| TdT rec (400 U/μl) | 1.0 μl |
| Oligonucleótido (100 ρmoles/μl) | 2.0 μl |
| H ₂ Odd | 8.0 μl |
| TE | <u>80.0 μl</u> |
| | 100 μl |

CALCULOS

[Oligo ρmoles/μl] = La concentración es obtenida con ayuda del programa OLIGO, en el cual se anota las cantidades que tiene el Iniciador de A, T, C, G, a sí como la absorbancia que nos dio la lectura de estos a una dilución 1:10.

$$\text{Conc. Iniciador } (\mu\text{l}) = 25 \text{ } \rho\text{moles} / [\text{Oligo } \rho\text{moles}/\mu\text{l}]$$

GLOSARIO

| | |
|--------------|---|
| AAS | Ácido Acetil Salicílico |
| β_2 -m | β_2 -microglobulina |
| CTLs | Linfocitos T citotóxicos |
| CLIP | Péptido invariable asociado a clase II |
| CY | Región citoplásmica |
| CPA | Célula presentadora de antígeno |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNTPs | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| ddUTP-Dig | Didesoxiuracilo trifosfato-Digoxigenina |
| EDTA | Ácido etilendiamino tetracético |
| FA | Frecuencia alélica |
| FE | Fracción etiológica |
| FP | Fracción preventiva |
| HLA | Antígenos leucocitarios humanos |
| HSP | Proteína de choque térmico |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular-1 |
| IL-2 | Interleucina-2 |
| IC | Intervalo de confianza |
| KDa | Kilodaltones |
| li | Cadena invariable |
| LTA | Linfotoxina α |
| LTB | Linfotoxina β |
| LMP | Proteasoma de bajo peso molecular |
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad |
| ml | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| N-CAM | Molécula de adhesión neural |
| NP | Poliposis nasal simple |
| p | Probabilidad |
| pc | Probabilidad corregida |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PCR-SSO | Tipificación con sondas específicas de secuencia |
| PCR-SSP | Tipificación con iniciadores específicos de secuencia |
| RM | Razón de momios |
| RR | Riesgo relativo |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SsDNA | Esperma de salmón |
| SSO | Oligonucleótidos específicos de secuencia |
| SSP | Iniciadores específicos de secuencia |
| TAP | Proteína transportadora de antígenos |
| TCR | Receptor de células T |
| TdT | Desoxinucleotidil transferasa terminal |
| TM | Región transmembranal |
| TAE | Tris acetato EDTA |
| TBE | Tris-borato EDTA |
| TE | Tris-HCl EDTA |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |

| | |
|---------------|---------------------------------|
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| μ l | Microlitros |
| UV | Ultravioleta |
| v/v | Volumen a volumen |
| χ^2 Y | Chi cuadrada de Yates |

BIBLIOGRAFÍA

1. Settipane GA, Lund VJ, Bernstein JM, Tos M. Nasal polyps: epidemiology, Pathogenesis and Treatment. 1997. OceanSide Publications, Inc. Providence, Rhode Island.
2. Settipane GA, Chafee FH. 1977. Nasal polyps in asthma and rhinitis: a review of 6,037 patients. *J Allergy Clin Immunol* 59: 17-21.
3. Widal MF, Abrami P, Lermoyez J. 1922. Anaphyaxie et idiosyncrasie. *Presse Med* 30: 189.
4. Samter M, Beers RF. 1967. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy* 40: 281-293.
5. Bent JP, Kuhn FA. 1994. The diagnosis of allergic fungal sinusitis. *Otolaryngol Head Neck* 111: 580-588.
6. Bent JP. Kuhn FA. 1996. Allergic fungal sinusitis/polyposis. *Allergy Asthma Proc* 17: 259-68.
7. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, Roberts GD. 1999. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc* 74: 877-884.
8. Drake-Lee A. 1992. Nasal polyps in identical twins. *J Laryngol Otol* 106: 1084-1085.
9. Lockey RF, Rucknagel DL, Vanselow NA. 1973. Familial occurrence of asthma, nasal polyps, and aspirin intolerance. *Ann Inter Med* 78: 17-24.
10. Mullol J, Xaubet A, Gaya A, Roca-Ferrer J, López E, Fernández JC, Fernández MD, Picado C. 1995. Cytokine gene expression and release from epithelial cells. A comparison study between healthy nasal mucosa and nasal polyps. *Clin Exp Allergy* 25: 607-615.
11. Naclerio R, Durham S, Mygind N. 1999. Rhinitis. Mechanisms and management. Marcel Dekker, Inc. New York.
12. Molnar-Gabor E, Endreffy E, Rozsasi A. 2000. HLA-DRB1, -DQA1 and DQB1 genotypes in patient with nasal polyposis. *Laryngoscope* 110: 422- 425.
13. Papón JF, Coste A, Gendron MC, Cordonnier C, Wingerstmann L, Peynegre R, Escudier E. 2002. HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *Laryngoscope* 112: 2067-2075.
14. Mizuky N, Inoko H, Ohno S. 1994. Role of HLA and T lymphocytes in the immune response. *Ocular Immunol Inflammat* 2:57-91.
15. So A. 1994. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. Lechler, R. HLA and Disease. Academic Press. Great Britain, pp1-34.
16. Aguado B, Milner CM, Campbell RD. 1996. Genes of the MHC class III region and the functions of the proteins they encode. HLA and MHC: Genes, Molecules, and Function. Browning M, McMichael A (eds). Oxford, UK, BIOS Scientific Publishers, p 39.

17. Klein J. 1986. *The Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. New York, Wiley.
18. Nedospasov SA, Hirt B, Shakhov AN, Dobrynin VN, Kawashima E, Accolla RS, Jongeneel CV. 1986. The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse. *Nucleic Acids Res* 14:7713-7725.
19. Muller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA, Lindahl KF, Steinmetz M. 1987. Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature* 325:265-267.
20. Gardner SM, Mock BA, Hilgers J, Huppi KE, Roeder WD. 1987. Mouse lymphotoxin and tumor necrosis factor: structural analysis of the cloned genes, physical linkage, and chromosomal position. *J Immunol* 139:476-483.
21. Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF, Ware CF. 1993. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72:847-856.
22. Bjorkman JH, Saper MA, Samaroui B, Nennet WS, Strominger JL, Wiley DC. 1987. Structure of the human histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-518.
23. Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. 1994. MHC class I/ β 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368:864-867.
24. Brodsky F, Lem L, Bresnahan P. 1996. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 47:464-471.
25. Brandan, Nora. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Universidad Nacional del Nordeste. <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>, consultada 22 de Febrero de 2010.
26. Rock KL. 1996. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 17:131-137.
27. Campbell RD, Trowsdale J. 1993. Map of the human MHC. *Immunol Today* 14:349-352.
28. http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/H/HLA_loci.gif.
29. Cresswell P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12:259-294.
30. Bodmer JH, Marsh SGE, Albert DE, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasasuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki P. 1995. Nomenclature for factors of the HLA system. 1995. *Human Immunol* 43:149-164.
31. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.

- 32.Madden DR. 1995. The three dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 12:181-208.
- 33.Raposo G, Nijman H, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding C, Melief C, Geuze H. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161-1172.
- 34.Gren JR, Weissman SM. 1997. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 90:4252-4265.
- 35.Peelman LJ, Chardon P, Vaiman M, Mattheeuws M, Van Zeveren A, Van de Weghe A, Bouquet Y, Campbell RD. 1996. A detailed physical map of the porcine major histocompatibility complex (MHC) class III region: comparison with human and mouse MHC class III regions. *Mamm Genome* 7:363-367.
- 36.Llanos C, Soto L, Sabugo F, Bastías J, Salazar L, Aguillón J, Cuchacovich M. The influence of -238 and -308 TNF polymorphisms on the pathogenesis and response to treatment in rheumatoid arthritis. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 1089-1095.
- 37.Luxenberger W, Posch U, Berghold A, Hofmann T, Lang-Loidolt D. 2000. HLA patterns in patients with nasal polyposis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257:137-139.
- 38.Sambrook J, Fitch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 39.Tsuji K, Aisawa M, Sasasaki T. 1992. *HLA 1991*. Oxford University Press, Oxford.
- 40.Bignon JD, Fernández-Viña M. 1995. *Technical Handbook, Twelfth International Histocompatibility Workshop*. Publisher: HLA et médecine. Paris, France.
- 41.Olerup O, Zetterquist H. 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39:225-235.
- 42.Svejgaard A, Platz P, Ryder LP: HLA and disease 1982- A survey. *Immunol Rev* 70:193, 1983.
- 43.Haldane JBS. 1956. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann. Hum. Genet.* 20:309-311.
- 44.Gorodezky C. 1996. Método para el análisis estadístico del complejo HLA para el proyecto de la génesis de las poblaciones hispanoamericanas en colaboración con la Real Academia de Ciencias de España, curso Teórico-Práctico de Actualización en Histocompatibilidad. pp17-23.
- 45.Bengtsson BO, Thomson G. 1981. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens* 17:356-363.
- 46.Fajardo-Dolci G, Solorio-Abreu J, Romero-Álvarez JC, Zavaleta-Villa B, Cerezo-Camacho O, Jiménez-Lucio R, Olivo-Díaz A. 2006. DQA1 and DQB1 association and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 135: 243-247.