



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RECEPTORES NKG2 Y SUS LIGANDOS EN PACIENTES CON TRASPLANTE DE
MÉDULA ÓSEA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

WENDY GUADALUPE VÁZQUEZ GONZÁLEZ

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

MÉXICO, D. F. ABRIL, 2014



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.

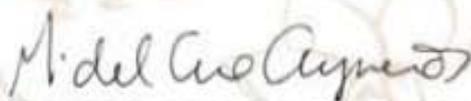
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de enero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **VÁZQUEZ GONZÁLEZ WENDY GUADALUPE** con número de cuenta **303292120**, con la tesis titulada **"RECEPTORES NKG2 Y SUS LIGANDOS EN PACIENTES CON TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
Vocal: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Suplente: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
Suplente: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de febrero de 2014



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme formar parte de su alumnado y desarrollarme profesionalmente.

Apoyos económicos recibidos para la realización de este proyecto:

Beca de Maestría CONACYT (No. de Becario: 270114)

Beca de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS (No. de Matrícula
99096422)

A los miembros del Comité Tutor por todas sus aportaciones para mejorar este proyecto:

Dra. María Isabel Soto Cruz

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Dedicatoria

En primer término no puedo dejar de agradecer al ser más maravilloso que he conocido y que Dios me dio el privilegio de tener a mi lado para aprender de él por los 26 años de mi vida, tú me enseñaste a enfrentar los problemas de la vida con valentía y ahora eres un ángel más en el cielo. Gracias a mamá Tita. TE AMO!

A ti mamá gracias por impulsarme a mejorar a ser mejor en la vida y creer en mí, sin tu apoyo nada de esto sería posible. Eres el motor de mi vida.

A mis hermanitos Irma, Lucero y Ricardo por creer en mí y cuidarme, los amo. A mis angelitos Rubí y Duraznita por hacerme disfrutar de la vida a su lado.

A mis muy queridos amigos Lupita, Adrián y Fabiola por apoyarme y darme ánimos en los momentos en los que estuve a punto de tirar la toalla. Por estar siempre dispuestos a ayudarme y disfrutar la vida juntos.

A mis compañeritos Israel, Jaime, Daniel, Julián, Kevin y Pilar por hacer del laboratorio un lugar más ameno para trabajar, así como por su solidaridad y apoyo para mis experimentos.

A mis compañeritos y amigos de la UIMI Rocío, Esteban, Hayde, Giovanna, Liliana, Paulina, Verónica, Mónica y Memo por convertirse más que en mis compañeros en mis amigos.

A un gran amigo Eduardo Montoya por siempre estar dispuesto a ayudarme, por enseñarme muchas cosas para mejorar mi trabajo y por regalarme tu amistad.

A mi más que amiga casi hermana Eyerahi Bravo te quiero mucho, eres un ser humano maravilloso gracias por todos tus consejos, así como por estar a mi lado en las alegrías y en las tristezas.

A mi tutora la Dra Martha Pérez por todo su apoyo. A su lado he aprendido mucho, gracias por orientarme y regañarme porque eso me ha ayudado a mejorar cada día. Por creer en mí y por preocuparse por mi bienestar no solo académico. La quiero mucho y nunca acabare de agradecer lo que ha hecho por mí.

Índice

Resumen	i
Abstract.....	ii
Abreviaturas.....	1
Introducción.....	3
Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.....	3
Definición.....	3
Fuente de células hematopoyéticas	3
Tipos de trasplante	4
Reacciones posteriores al trasplante.....	5
Régimen de acondicionamiento	6
Reconstitución inmunológica.....	8
Enfermedad de injerto contra hospedero (EICH)	8
Enfermedad injerto contra hospedero aguda.....	10
Enfermedad injerto contra hospedero crónica.....	11
Inmunología de la EICH	12
Células NK.....	15
Función de la célula NK.....	15
Receptores de la célula NK	16
Familia de receptores NKG2	17
Receptores NKG2A y NKG2C.....	17
Ligando del receptor NKG2A y NKG2C: HLA-E.....	18
Receptor NKG2D	19
Ligandos de NKG2D	21
Receptores NKG2 y TCPH.....	24
Planteamiento del problema	25
Hipótesis	26

Objetivos.....	27
Diseño experimental	28
Metodología.....	30
Diagrama de flujo	33
Resultados.....	34
Población de estudio	34
Controles	35
Alelos y genotipos.....	35
Haplotipos	36
Pretrasplante.....	39
Alelos y genotipos.....	39
Haplotipos	40
Postrasplante	42
Alelos y genotipos.....	42
Haplotipos	44
Expresión génica relativa: NKG2D y MIC.....	46
Discusión de resultados	47
Conclusiones.....	51
Perspectivas	52
Referencias	53

Resumen

La enfermedad injerto contra hospedero (EICH) es el principal riesgo posterior al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), presentándose en más del 60% de los pacientes. Esta enfermedad es originada por reacción (sobre-activación) de las células aloreactivas (células NK y linfocitos T CD8+) del donador en contra del tejido del hospedero. De manera previa, la actividad citotóxica de estas células ha sido definida por la presencia de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en genes de la familia de receptores NKG2 que conforman dos haplotipos; asociados con la alta capacidad citotóxica como HNK1 y HNK2, así como con la baja capacidad citotóxica LNK1 y LNK2. El objetivo de este trabajo fue identificar la asociación de SNPs de la familia de receptores NKG2 en el desarrollo de EICH. Al respecto, se estudiaron un total de 55 binomios, donador-receptor (pretrasplante y postrasplante), así como un grupo control de 235 individuos para conocer la frecuencia de estos SNPs en población mexicana. Para cumplir el objetivo, se realizó la discriminación alélica de los SNPs de los genes; NKG2A (C-798G), NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G), y NKG2D (C17288G, A7374G y G5326A). Además, se determinó la expresión génica relativa de MIC y NKG2D por PCR en tiempo real. Pretrasplante, el análisis del alelo G y el genotipo GG del SNP A7374G (NKG2D), además del haplotipo HNK2 muestran asociación con protección estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para el desarrollo de leucemia [RM=0.5228 IC95% (0.2845-0.9607), RM=0.5000, IC95% (0.2548-0.9812), RM=0.5400 IC95% (0.2900-0.9800), respectivamente]. En contraste, el haplotipo NK2a (detectado en la población de estudio) se encuentra asociado con el riesgo a padecer esta enfermedad [RM=5.5500 IC95% (1.4600-21.020), $p < 0.05$]. Postrasplante, se observan tendencias de riesgo de los alelos G y genotipos GG de los SNPs A7374G y G5326A además del haplotipo HNK2 a padecer EICH. Los niveles de expresión del gen NKG2D en pacientes con EICH crónico (HNK2/HNK2) son mayores que en pacientes libres de EICH (LNK2/HNK2) ($p < 0.05$). En pacientes los SNPs del receptor NKG2D se podrían utilizar como biomarcadores de leucemia. No obstante lo anterior, se considera necesario aumentar el tamaño de muestra para confirmar que el haplotipo HNK2 constituye un factor de riesgo para EICH. Además de cambios en la expresión de NKG2D, cabe la posibilidad que el haplotipo LNK2 en el grupo de pacientes libres de EICH provoque alteraciones en la capacidad citotóxica de células aloreactivas.

Abstract

Graft-versus-host disease (GVHD) is the major risk after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), occurring in over 60% of patients. GVHD results from immunological attack on target recipient tissues by donor alloreactive cells (NK cells and CD8+). The cytotoxic activity of these cells has been defined in terms of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene region of NKG2 receptors, identifying two haplotypes: high-activity-related haplotype (HNK1 and HNK2) and low-activity-related haplotype (LNK1 and LNK2). The aim of this study was to evaluate the association between NKG2 receptors polymorphisms and the development of GVHD. We studied 55 donor-recipient pairs (before and after HSCT) and 235 controls to determine the frequency of these polymorphisms in the Mexican population. We conducted SNP genotyping of NKG2A (C-798G), NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G) and NKG2D (C17288G, A7374G y G5326A). Moreover, we analyzed the NKG2D and MIC gene expression by real time PCR. Before HSCT, the G allele, the GG genotype of the A7374G polymorphism (NKG2D) and the HNK2 haplotype may protect against the development of leukemia [$p < 0.05$, OR=0.5228 95% CI=0.2845-0.9607, OR=0.5000, 95% CI=0.2548-0.9812, OR=0.5400 95% CI=0.2900-0.9800, respectively]. In contrast, the NK2a haplotype (found in our population) was associated with an increased risk of leukemia [$p < 0.05$, OR=5.5500 95% CI=1.4600-21.020]. After HSCT, our study revealed a trend towards increased risk of EICH with the G alleles and genotypes GG (A7374G and G5326A polymorphisms), as well as haplotype HNK2, are present. The expression levels of NKG2D gene in patients with chronic GVHD (HNK2/HNK2) are higher than in patients without GVHD (LNK2/HNK2) ($p < 0.05$). NKG2D receptor polymorphisms could be used as biomarkers in patients with leukemia. Although it is necessary to increase the sample size, HNK2 haplotype could be associated with an increased risk of the development of GVHD. Furthermore of NKG2D gene expression variations, it is possible that the LNK2 haplotype in the group of patients without GVHD could be associated with an altered cytotoxic activity of these alloreactive cells.

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BCR	Receptor de células B (Por sus siglas en inglés: <u>B</u> <u>C</u>ell <u>R</u>eceptor)
CMV	Citomegalovirus
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
DAP	Proteína adaptadora a dominios (Por sus siglas en inglés: <u>D</u>omain <u>A</u>dapter <u>P</u>rotein)
DAMP	Patrones Moleculares Asociados a Daño (Por sus siglas en inglés: <u>D</u>amage-<u>A</u>ssociated <u>M</u>olecular <u>P</u>attern molecules)
EHCI	Efecto Hospedero Contra Injerto
EICH	Enfermedad Injerto Contra Hospedero
EICHa	Enfermedad Injerto Contra Hospedero Aguda
EICHc	Enfermedad Injerto Contra Hospedero Crónica
EICL	Efecto Injerto Contra Leucemia
Fas	Receptor de Muerte Celular de la Familia de TNF
G-CSF	Factor Estimulador de Colonias Granucíticas (Por sus siglas en inglés: <u>G</u>ranulocyte <u>C</u>olony-<u>S</u>timulating <u>F</u>actor)
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias Granucíticas y Macrófagos (Por sus siglas en inglés: <u>G</u>ranulocyte <u>M</u>acrophage <u>C</u>olony-<u>S</u>timulating <u>F</u>actor)
GRB2	Proteína 2 de Unión al Receptor del Factor de Crecimiento (Por sus siglas en inglés: <u>G</u>rowth factor <u>R</u>eceptor-<u>B</u>ound protein <u>2</u>)
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos (Por sus siglas en inglés: <u>H</u>uman <u>L</u>eukocyte <u>A</u>ntigen)
IC	Intervalo de Confianza
IFN	Interferón
IL	Interleucina
ITAM	Motivo Inmunorreceptor de Activación Basado en Tirosina (Por sus siglas en inglés: <u>I</u>mmunoreceptor <u>T</u>yrosine-based <u>A</u>ctivation <u>M</u>otif)
ITIM	Motivo Inmunorreceptor de Inhibición Basado en Tirosina (Por sus siglas en inglés: <u>I</u>mmunoreceptor <u>T</u>yrosine-based <u>I</u>nhibitory <u>M</u>otif)
KIR	Receptores tipo Inmunoglobulina (Por sus siglas en inglés: <u>K</u>iller cell <u>I</u>mmunoglobulin-like <u>R</u>eceptors)
KLRK1	Receptores de célula NK tipo lectina (Por sus siglas en inglés: <u>K</u>iller cell <u>L</u>ectin like <u>R</u>eceptor subfamily <u>K</u> member <u>1</u>)
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crónica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
MIC	Gen relacionado con la cadena MHC de clase I (Por sus siglas en inglés: <u>M</u>HC)

	<i>class I <u>C</u>hain-related)</i>
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (Por sus siglas en inglés: <u>M</u>ajor <u>H</u>istocompatibility <u>C</u>omplex))
NCBI	Centro Nacional de Biotecnología e Información (Por sus siglas en inglés: <u>N</u>ational <u>C</u>enter for <u>B</u>iotec<u>n</u>ology <u>I</u>nformation))
NK	Célula Asesina Natural (Por sus siglas en inglés: <u>N</u>atural <u>K</u>iller cell))
NKC	Complejo NK (Por sus siglas en inglés: <u>N</u>atural <u>K</u>iller <u>C</u>omplex))
NKG2	Familia de Receptores NK del Grupo 2 (Por sus siglas en inglés: <u>N</u>atural <u>K</u>iller <u>G</u>roup <u>2</u>))
NLR	Receptores Tipo NOD (Por sus siglas en inglés: <u>N</u>ucleotide-binding <u>O</u>ligomerization <u>D</u>omain <u>R</u>eceptors))
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Por sus siglas en inglés: <u>P</u>athogen-<u>A</u>ssociated <u>M</u>olecular <u>P</u>attern molecules))
PKC	Cinasa 1 dependiente de fosfoinositol (Por sus siglas en inglés <u>P</u>hosphoinositide-<u>D</u>ependent <u>K</u>inase <u>1</u>))
PKB	Proteína cinasa B (Por sus siglas en inglés <u>P</u>rotein <u>K</u>inase <u>B</u>))
PIP2	4,5 bifosfato de fosfoinositol (Por sus siglas en inglés: <u>P</u>hosphatidylinositol-4,5-<u>b</u>isphosphate))
PIP3	3,4,5 trifosfato de fosfoinositol (Por sus siglas en inglés: <u>P</u>hosphatidylinositol <u>3</u>,<u>4</u>,<u>5</u>-<u>t</u>riphosphate))
PI3K	4,5 Bifosfato de Fosfatodilinositol 3 cinasa (Por sus siglas en inglés: <u>P</u>hosphatidylinositol-4,5-<u>b</u>isphosphate <u>3</u>-<u>K</u>inase))
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones (Por sus siglas en inglés: <u>P</u>attern <u>R</u>ecognition <u>R</u>eceptor))
RE	Retículo Endoplásmico
RM	Razón de Momios
RT-PCR	Retrotranscripción de Reacción en cadena de la Polimerasa (Por sus siglas en inglés: <u>R</u>everse <u>t</u>ranscription <u>p</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction))
SNP	Polimorfismo de un Solo Nucléotido (Por sus siglas en inglés: <u>S</u>ingle <u>N</u>ucleotide <u>P</u>olymorphism))
SPM	Sangre Periférica Movilizada
TAP	Transportador Asociado al Procesamiento de Antígenos
TCPH	Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas
TCR	Receptor de células T (Por sus siglas en inglés: <u>T</u> <u>C</u>ell <u>R</u>eceptor))
TLR	Receptores Tipo Toll (Por sus siglas en inglés: <u>T</u>oll-<u>L</u>ike <u>R</u>eceptor))
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (Por sus siglas en inglés: <u>T</u>umor <u>N</u>ecrosis <u>F</u>actor))
TRAIL	Ligando Inductor de Apoptosis (Por sus siglas en inglés: <u>R</u>elated <u>A</u>ptosis-<u>I</u>nducing <u>L</u>igand <u>T</u>NF))
ULBP	Proteína de Unión Larga Única (Por sus siglas en inglés: <u>U</u>nique <u>L</u>ong-<u>B</u>inding <u>P</u>rotein))
VAV1	Factor Intercambiador de Guanina
VEB	Virus de Epstein-Barr
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Introducción

Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

Definición

El trasplante de células hematopoyéticas (TCPH) es una terapia intensiva usada para tratar desórdenes hematológicos y enfermedades genéticas (Li, 2012; Gyurkocza, 2007).

El TCPH involucra el tratamiento de los pacientes (receptores) con quimioterapia y/o radioterapia seguida por la infusión de un injerto proveniente de un donador el cual contiene células troncales y progenitoras hematopoyéticas con o sin células de la respuesta inmunológica como linfocitos T, B y *Natural Killers* (NK) (Li, 2012).

El trasplante fue en un inicio usado para restaurar la población de células hematopoyéticas en pacientes que reciben altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia para tratar malignidades hematológicas tales como las leucemias. La quimioterapia y/o radioterapia causan falla medular, por lo que las células troncales hematopoyéticas de un donador reconstituyen el sistema hematopoyético en estos pacientes (Li, 2012).

El número estimado de TCPH que se llevan a cabo a nivel mundial va de 55,000-60,000 por año y la mayoría de alotrasplantes se emplea como tratamiento para malignidades hematológicas (Gyurkocza, 2007).

Fuente de células hematopoyéticas

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) para este trasplante pueden ser obtenidas de la médula ósea, de sangre periférica movilizada con citocinas (SPM) o de cordón umbilical (Li, 2012).

El uso de médula ósea como fuente de CPH requiere la colecta de células mediante múltiples aspirados en la cavidad medular de las crestas ilíacas posteriores. Este procedimiento se realiza en quirófano, con los riesgos que implica la administración de anestesia general en el donador. Por lo anterior, la médula ósea fue hasta los 1990 la principal fuente de CPH (Apperley, 2000; Li, 2012).

A mediados de los años 90s comenzó a ser utilizada SPM gracias a protocolos de movilización de precursores hematopoyéticos a sangre periférica (usando citocinas como G-CSF o GM-CSF). A diferencia de médula ósea, la colecta de CPH de SPM no

requiere la administración de anestesia general además de ofrecer la posibilidad de colectar 10 veces más CPH. El mayor número de estas células facilita el injerto neutrófilos y plaquetas además de reducir el riesgo de falla del injerto. Para este trasplante únicamente se requiere la administración de citocinas por 4 a 6 días seguida por la aféresis para colecta de CPH (Apperley, 2000; Li, 2012; Chen, 2013).

La sangre de cordón umbilical, también es una fuente rica en células hematopoyéticas que ha sido empleada como una fuente alterna para trasplante. En 1995, fue reportado el uso de sangre de cordón umbilical como fuente de CPH para un trasplante alogénico en niños con leucemia (Wagner, 1995). El número limitado de células hematopoyéticas disponibles para este tipo de trasplante (aproximadamente una unidad de cordón umbilical contiene 1/10 de la cantidad de células que pueden ser obtenidas a partir de medula ósea y de 1/20 a 1/30 del injerto obtenido a partir de SPM) restringió este trasplante al uso pediátrico. Para incrementar la utilidad de la sangre de cordón umbilical como fuente de CPH en adultos se ha empleado el uso de dos unidades de cordón umbilical no relacionadas y compatibles entre sí, así como con el receptor, lo cual ha demostrado brindar suficiente número de CPH para lograr el injerto en adultos mejorando la reconstitución inmunológica (Welniak, 2007; Li, 2012).

En la donación alogénica el volumen máximo colectado no debe ser de 10 a 20mL/kg. El número mínimo de células nucleadas recomendado para el injerto es de 2×10^8 por kilogramo del receptor. El volumen total no excede el 1500ml para adultos (Apperly, 2000).

Tipos de trasplante

TCHP puede ser categorizado en autólogo o alogénico con base a la fuente de CPH. En el trasplante autólogo, las células hematopoyéticas infundidas al paciente son ellos mismos, mientras que el trasplante alogénico o relacionado es aquel que se lleva a cabo entre individuos de una misma especie. En este aspecto, las diferencias entre antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) así como antígenos del complejo menor de histocompatibilidad pueden originar una respuesta inmunológica lo cual resulta en el rechazo del injerto o en la aparición de enfermedad injerto contra hospedero (EICH) (Li, 2012).

Los donadores en primera línea para el TCPH alogénico son los hermanos de los pacientes que poseen compatibilidad HLA. Cuando no se cuenta con este tipo de

donadores pueden ser empleados donadores compatibles en HLA no relacionados. A pesar del rápido incremento de individuos en los registros de bancos de donadores a nivel mundial en los últimos 20 años la disponibilidad de donadores no relacionados es limitada especialmente para pacientes con genotipos HLA poco frecuentes (Wei, 2012).

Dentro de los estudios que se realizan al donador antes de la colecta de CPH se incluyen los mínimos necesarios tales como (Chen, 2013):

- Tipificación de los antígenos leucocitarios humanos, siendo los estudios mínimos (HLA) -A, -B y DR en un laboratorio certificado para estudios de inmunogenética.
- Grupo sanguíneo ABO además del factor Rh.
- Estudio para enfermedades infecciosas como virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis A, B, C, citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein-Barr (VEB), así como el análisis serológico para sífilis y toxoplasmosis.
- Química sanguínea completa que incluye el análisis de glucosa, urea, creatinina, tiempos de coagulación y enzimas hepáticas.

Reacciones posteriores al trasplante

Estudios clínicos y de laboratorio han mostrado que en el trasplante alogénico la reconstitución inmune puede mediar el efecto injerto contra leucemia (EICL), en el cual las células del sistema inmunológico derivadas del donador erradican células tumorales del hospedero. Sin embargo, este efecto benéfico es mediado en gran parte por células citotóxicas las cuales también han sido asociadas con la principal complicación posterior al trasplante, el desarrollo de EICH. En la EICH el tejido normal del hospedero es atacado por células del donador, generalmente asociado al daño del tejido generado durante el régimen preparativo o de acondicionamiento pretrasplante (Li, 2012).

Antes de la infusión de las células del donador se requiere la manipulación del injerto para minimizar la aparición de EICH. Las células alorreactivas (células T y NK) del donador pueden ser removidas para reducir la frecuencia y la severidad de EICH tanto en trasplante de médula ósea como de SPM ya sea con disparidades o compatibilidad en HLA entre el binomio donador-receptor. Aunque este procedimiento aumenta el riesgo de rechazo del injerto, infección viral y recaída a la enfermedad

neoplásica comparado con injertos en los cuales no se eliminan las células alorreactivas (Li, 2012).

En contraste, las células inmunocompetentes remanentes en el receptor después de la irradiación puede presentar una reacción inmunológica contra el injerto resultando en la recaída o rechazo del injerto, reacción conocida como efecto hospedero contra injerto (EHCI) (Li, 2012).

Estudios preclínicos muestran que el rechazo a las CPH alogénicas del injerto puede ser mediado por las células NK, células NKT, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T CD8+ y CD4+ del receptor que reconocen los antígenos HLA en las células del donador. En la práctica clínica el rechazo del injerto tanto de médula ósea como de SPM HLA compatible es muy poco frecuente. El rechazo o falla de injerto puede ser evaluada por el número de leucocitos en sangre periférica, la celularidad en la médula ósea o ausencia de quimerismo del donador dentro de los primeros tres meses postrasplante.

Para prevenir el rechazo del injerto y el EICH se emplea un tratamiento inmunosupresor postrasplante. Esta profilaxis se administra en la mayoría de los protocolos de trasplante y comúnmente se emplean fármacos como inhibidores de calcineurina como la ciclosporina A (CsA) y el tacrolimus los cuales bloquean la producción de interleucina 2 y la expansión de células T, así como corticosteroides que son agentes linfocíticos de forma única o en combinación (Welniak, 2007).

Régimen de acondicionamiento

El régimen de acondicionamiento o preparativo, consiste en la administración de una o más drogas citotóxicas y puede o no incluir la irradiación corporal total. En el receptor, la administración de este acondicionamiento es esencial para el éxito del trasplante (Welniak, 2007).

Los principales objetivos de un régimen de acondicionamiento son (Welniak, 2007; Apperly, 2000):

- Crear espacio disponible para el injerto de CPH provenientes del donador.
- Eliminar células tumorales: Las altas dosis de quimioterapia buscan disminuir la carga de células tumorales presentes en el paciente antes de la infusión de las células del donador.

- Eliminar o suprimir la inmunidad del hospedero para permitir el injerto de las CPH: La alta intensidad del régimen de acondicionamiento (acondicionamiento mieloablativo) reduce las células inmunocompetentes en el receptor, y permite el trasplante incluso cuando existen discrepancias en HLA entre donador y receptor limitando la habilidad para rechazar el injerto. Sin embargo, este régimen de acondicionamiento puede inducir al marcado incremento de toxicidad debido a que este régimen induce daño al tejido y la liberación de potentes mediadores proinflamatorios. Se ha descrito que las altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia usadas durante el acondicionamiento inducen citotoxicidad severa limitando el uso del TCPH para pacientes jóvenes. Los regímenes de acondicionamiento de baja intensidad en los que se emplean dosis menores de fármacos citorreductivos, se usan para pacientes de edad avanzada o que presentan comorbilidades asociadas con la intolerancia a la toxicidad de un régimen convencional, que comprometería la vida del paciente. Sin embargo, los pacientes sometidos al régimen de acondicionamiento de baja intensidad presentan un índice de recaída mayor que los pacientes con régimen mieloablativo (Li, 2012; Petersen, 2006).

Existen otros factores importantes que después de numerosas investigaciones se han asociado al éxito del trasplante, entre ellos:

- La fuente del tejido, pureza y número de células inmunes del donador infundidas: En el inóculo es importante definir la cantidad y el índice de los subgrupos de células T, células NKT y NK ya que estas difieren entre tejidos afectando la inducción de EICH y EICL. La presencia de células no linfoides como precursores mieloides en el injerto también influye en el resultado postrasplante (Li, 2012).
- La microflora endógena y la presencia o ausencia de patógenos oportunistas: esto puede afectar marcadamente la sensibilidad y la respuesta al régimen de acondicionamiento (Maeda, 2013).
- La edad de los donadores y receptores: receptores de mayor edad pueden ser más sensibles a un esquema de acondicionamiento y puede haber diferencias en la función inmunológica comparando con receptores jóvenes. Clínicamente la edad del donador y del receptor puede ser un factor pronóstico importante para el desarrollo y severidad de la EICH (Li, 2012).

Reconstitución inmunológica

El principal problema que limita la eficacia del TCPH alogénico es la reconstitución inmunológica sin incrementar el riesgo de la EICH. Los pacientes postrasplante están profundamente inmunosuprimidos después del trasplante como resultado del régimen de acondicionamiento mieloablatoivo, drogas inmunosupresoras que reducen la EICH, y por el bajo número de células T comparado con un individuo inmunocompetente. Postrasplante, hay dos fuentes de células T para el receptor; expansión periférica de células T maduras o producción de células T vírgen derivadas de los progenitores hematopoyéticos trasplantados, producidos en el timo del receptor. En etapa adulta el timo disminuye su capacidad de producir células T, además el régimen de acondicionamiento puede inducir daño a células epiteliales del timo y disminuir la producción de IL-7, una interleucina necesaria para la supervivencia y desarrollo de timocitos. Por lo tanto, la reducida habilidad para regenerar células T esta en función de la edad e intensidad del régimen de acondicionamiento, por lo que un receptor de TCPH de edad avanzada está muy limitado para recobrar el repertorio de células T postrasplante. La capacidad de recobrar números celulares se asocia con riesgo incrementado a infecciones oportunistas y una disminuida habilidad para regenerar una respuesta a la vacunación (Welniak, 2007).

Se requiere un periodo de tiempo considerable (1 a 2 años) para completar la regeneración de los compartimentos de células T y B periodo totalmente dependiente de la edad y dosis quimioterapéuticas administradas antes del trasplante (Li, 2012). Los linfocitos T CD8⁺ normalizan más rápidamente que las cuentas de CD4⁺, resultando en una inversión del ratio CD4:CD8 después de 6 a 9 meses postrasplante. Las células NK aparecen pocas semanas después del trasplante como células de origen linfoide predominantes en los primeros meses postrasplante (Parkman, 2004).

Enfermedad de injerto contra hospedero (EICH)

En los primeros estudios las investigaciones mostraron que la médula ósea de donadores HLA-idénticos causaba una enfermedad secundaria que resultaba ser letal definida por debilidad, diarrea y lesiones en la piel. Esta enfermedad comúnmente conocida como EICH es resultado del reconocimiento de variaciones genéticas entre el donador y receptor por parte de las células inmunocompetentes del injerto, en las que el receptor es incapaz de rechazar dichas células del donador (Ferrara, 2009).

La EICH es la principal complicación del TCPH, que conlleva un desorden



Fig 1. Enfermedad injerto contra hospedero aguda en piel (grado I)

Tomado de Ferrara, 2009

inmunológico que afecta muchos órganos de sistemas diferentes, incluyendo tracto gastrointestinal, hígado, piel y pulmones. El número de pacientes con esta complicación va a la alza junto con el número de trasplantes que se realiza por año, y muchos de los pacientes regresan al centro de trasplante para continuar con tratamiento de fármacos inmunosupresores incrementando el riesgo de infecciones graves (Maeda, 2013).

En 1966 Billingham postuló que para el desarrollo de la EICH: el injerto debe contener células inmunológicamente competentes, el receptor debe expresar antígenos de tejido que no están presentes en el donador y el sistema inmunológico del paciente debe ser incapaz de

desarrollar una respuesta efectiva para eliminar las células trasplantadas. Ahora se sabe que las células inmunológicamente competentes son linfocitos T y NK transferidos de una persona a otra que es incapaz de eliminar dichas células (Ferrara, 2009).

La EICH, es una enfermedad inflamatoria que surge cuando las células alorreactivas del donador responden a proteínas definidas genéticamente en el hospedero. La mayoría de proteínas importantes involucradas en esta enfermedad son antígenos HLA los cuales son altamente polimórficos y son codificados dentro del MHC. Las proteínas del MHC de clase I (A, B y C) son expresadas en la mayoría de células nucleadas del cuerpo a varias densidades. Las proteínas de clase II (DR, DP y DQ) son expresadas principalmente en células hematopoyéticas (células B, células dendríticas y monocitos) aunque su expresión puede ser inducida en muchos tipos celulares después de inflamación o daño. La compatibilidad HLA entre donador y receptor puede afectar la cinética del trasplante: el desarrollo de la EICH y EICL (Ferrara, 2009).

Entre hermanos sólo hay 25% de posibilidad de ser compatibles en la totalidad de los antígenos del *locus*, mientras que todos los demás miembros de la familia (padres

y hermanos) usualmente comparten un haplotipo con el paciente pero pueden diferir en un rango de 0 a 3 *loci* en HLA-A, -B y -DR en el segundo haplotipo (Welniak, 2009).

La EICH puede ser clasificada en aguda o crónica. La enfermedad aguda fue originalmente definida como la enfermedad que aparece dentro de los primeros 100 días postrasplante, mientras que la enfermedad crónica aparece posterior a este periodo de tiempo. La EICH aguda afecta órganos como la piel, hígado, pulmón, timo, además de órganos linfoides secundarios y es caracterizada por una respuesta celular tipo Th1 y una linfocitopenia de células B asociada. La enfermedad crónica también afecta a piel y mucosas pero involucra membranas serosas y glándulas exocrinas; es una patología de origen autoinmune que incluye la formación de auto anticuerpos (Welniak, 2009).

La frecuencia de EICH agudo está directamente relacionada al grado de discrepancia de las proteínas HLA y por tanto idealmente los donadores y receptores son compatibles en HLA A, B, C, DQ y DR (referido como compatibilidad 10/10) (Welniak, 2009).

A pesar de la compatibilidad HLA con donador aproximadamente del 40% al 50% de los pacientes desarrolla un EICH agudo sistémico que requiere tratamiento con altas dosis de esteroides (Paczesny, 2009). Este desorden es debido a diferencias fuera del *locus* HLA y que codifican proteínas referidas como antígenos del complejo menor de histocompatibilidad que son blanco para la EICH e EICL. Por lo tanto, es necesario implementar estrategias para identificar al donador ideal lo cual probablemente incorpore factores genéticos adicionales a la determinación de HLA (Welniak, 2009).

Enfermedad injerto contra hospedero aguda

La EICH aguda es definida por su surgimiento antes de los 100 días postrasplante. La EICH aguda incluye la afección a regiones de piel en el 81% de los pacientes, tracto gastrointestinal (54%) e hígado (50%) (Ferrara, 2009).

La piel es usualmente el primer órgano afectado (Fig.1) y generalmente coincide con el injerto de las células del donador. En esta enfermedad es característico el *rash* macropapular con prurito, que puede extenderse por todo el cuerpo incluso el cuero cabelludo. En casos severos se pueden formar ampollas en la piel y ulcerarse. Características adicionales incluyen la disqueratosis, los linfocitos satelitales adyacentes a los queratinocitos epidermales y la infiltración linfocítica perivascular en la dermis (Ferrara, 2009).

La afectación del tracto gastrointestinal que involucra el EICH agudo usualmente presenta diarrea, vómito, anorexia, dolor abdominal o una combinación de síntomas cuando es más severa. La diarrea en la EICH es generalmente secretoria y voluminosa (más de 2L por día). El sangrado, el cual es de mal pronóstico, es resultado de la ulceración de la mucosa. Radiológicamente se encuentra que el tracto gastrointestinal incluye la dilatación luminal con engrosamiento de la pared del intestino delgado y fluidos sugestivos en el íleon. Las características histológicas incluyen ulceraciones, cuerpos apoptóticos en la base de las criptas, abscesos en las criptas, además de la pérdida y achatamiento de la superficie epitelial (Ferrara, 2009).

La EICH en hígado puede ser difícil de distinguir de otras causas de disfunción de este órgano después del trasplante, como: la enfermedad venoclusiva, efectos tóxicos de drogas, infección viral, sepsis o sobrecarga de hierro. Las características histológicas del EICH son endotelialitis, infiltración linfocítica de las áreas portales, pericolangitis y destrucción del conducto biliar. Sin embargo, pocas veces se lleva a cabo la biopsia debido a la trombocitopenia postrasplante (Ferrara, 2009).

La severidad del EICH agudo es categorizada por la extensión y afección de los tres principales órganos mencionados anteriormente; grado I (leve), grado II (moderado), grado III (severo) y grado IV (muy severo). La EICH severa tiene mal pronóstico ya que sólo 25% de pacientes sobreviven por más de 5 años, mientras que sólo 5% de los pacientes con EICH grado IV sobreviven por más de 5 años (Paczesny, 2009).

La prevalencia de EICH agudo está directamente relacionada al grado de discrepancia entre proteínas HLA. La EICH aguda se presenta en 35 al 45% de los pacientes con donador HLA compatibles mientras que en 60 a 80% de los pacientes que reciben células de un donador con discrepancia HLA (Li, 2012).

Enfermedad injerto contra hospedero crónica

La EICH crónica es la principal causa de muerte posterior al TCPH. Esta enfermedad puede presentarse en forma progresiva (activa o aguda que se convierte en crónica), quiescente (enfermedad aguda que se resuelve completamente pero seguida después por crónica) o de *novo*. La edad del receptor y la historia previa de EICH agudo son los principales factores de riesgo para EICH crónico. Las manifestaciones de EICH crónico

son típicamente de naturaleza autoinmune. Los signos clínicos son generalmente vistos primero en la mucosa oral (Ferrara, 2009).

Inmunología de la EICH

Importantes aspectos son considerados con respecto a la fisiopatología de esta enfermedad. La enfermedad es un indicativo de exacerbados pero típicos mecanismos inflamatorios mediados por linfocitos del donador infundidos en el receptor, los cuales funcionan apropiadamente en función del ambiente no-propio al que se enfrentan. En la progresión de la EICH aguda puede distinguirse tres fases o etapas: (1) activación de las células presentadoras de antígenos (CPAs); (2) activación de las células T del donador, proliferación, diferenciación y migración; y (3) destrucción del tejido blanco (Maeda, 2013).

1. Este paso involucra la activación de las CPAs, por mecanismos propios de la enfermedad y del régimen de acondicionamiento del trasplante. El régimen de acondicionamiento causa daño, estrés celular y desencadena la muerte de las células epiteliales, lo cual provoca la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que tienen un papel crítico en el desarrollo de EICH. Entre los DAMPs secretados por el tejido se incluyen citocinas proinflamatorias (TNF α , e interleucinas 1 y 6), quimiocinas y sobreexpresión de moléculas de adhesión, antígenos del MHC y moléculas coestimuladoras en las CPAs. Estos mediadores solubles promueven la activación y maduración de CPAs, así como la rápida proliferación de células T del donador (Maeda, 2013).

El daño al tracto gastrointestinal durante el régimen de acondicionamiento es especialmente importante ya que este permite la traslocación sistémica de un estímulo inflamatorio adicional tales como productos microbianos incluyendo lipopolisacáridos u otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que además mejoran la activación de las CPAs (Welniak, 2007). Después del régimen de acondicionamiento, el tejido dañado en el tracto gastrointestinal permite el tránsito de bacterias, el sistema inmune identifica estas estructuras conservadas (patrones moleculares) en estos microorganismos. La mayoría de las células de la respuesta inmune expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) para el reconocimiento de los PAMPs como los receptores tipo

Toll (TLRs) y dominios de oligomerización tipo NOD (NLRs). La unión de PAMPs con PRRs activa las CPAs como parte de la respuesta inmune innata, induciendo la sobreexpresión de citocinas, moléculas del MHC, moléculas coestimuladoras y promoviendo la migración de CPAs al área de las células T en nódulos linfáticos (Maeda, 2013). Probablemente el tejido linfoide secundario en el tracto gastrointestinal es el sitio inicial de interacción entre las CPAs y linfocitos. De ahí que una importante estrategia para minimizar la enfermedad sea la aplicación de un régimen de acondicionamiento intensidad reducida (Ferrara, 2009).

2. En esta fase de la EICH, las células T del donador se activan mediante el reconocimiento y la interacción con moléculas de superficie de linfocito T (TCR y moléculas coestimuladoras) con sus respectivos ligandos expresados en CPAs en tejido linfoide secundario (Welniak, 2007).

Este estadio también comprende la expansión y diferenciación de células T aloreactivas Th1 y Th2 asociadas con diferentes manifestaciones de EICH. Las señales de daño generadas en la primera fase argumentan esta activación, al menos en parte, debido al incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras. En la mayoría de los trasplantes HLA compatibles tanto los subgrupos CD4+, como CD8+ responden a antígenos del complejo menor de histocompatibilidad causando la enfermedad (Maeda, 2013).

La activación de células de la respuesta inmune resulta en una rápida cascada bioquímica intracelular que induce la transcripción de genes para muchas proteínas incluyendo citocinas y sus receptores. Las citocinas Th1 (Interferón γ , TNF α e interleucina 2) son liberados en grandes cantidades durante EICH agudo (Maeda, 2013).

3. Esta fase es inicia con la migración de las células activadas al tejido blanco de EICH (intestino, hígado, piel y pulmón) seguido por el reclutamiento de otros leucocitos efectores resultando en el subsecuente daño al tejido. En esta fase participan una compleja red de mediadores celulares tales como linfocitos T citotóxicos y células NK, además de agentes solubles proinflamatorios (entre ellos; TNF α , interferón γ , interleucina 1 y óxido nítrico). Células y moléculas trabajan sinérgicamente para amplificar el daño local al tejido además promover

la inflamación y la destrucción. El daño al tejido conduce a señales proinflamatorias perpetuando el progreso de la enfermedad por contribuir a la secreción de citocinas (Welniak, 2007).

El estado efector de la enfermedad es definido por la destrucción del tejido blanco por células inmunocompetentes (principalmente células NK y linfocitos CD8+), así como moléculas efectoras (FasL, TNF α , ligando inductor de apoptosis (TRAIL), granzima, perforina e interferon γ). Ambos tipos celulares están involucrados tanto en EICH como en EICL (Maeda, 2013). En la Fig. 2 se esquematizan cada una de las etapas descritas anteriormente.

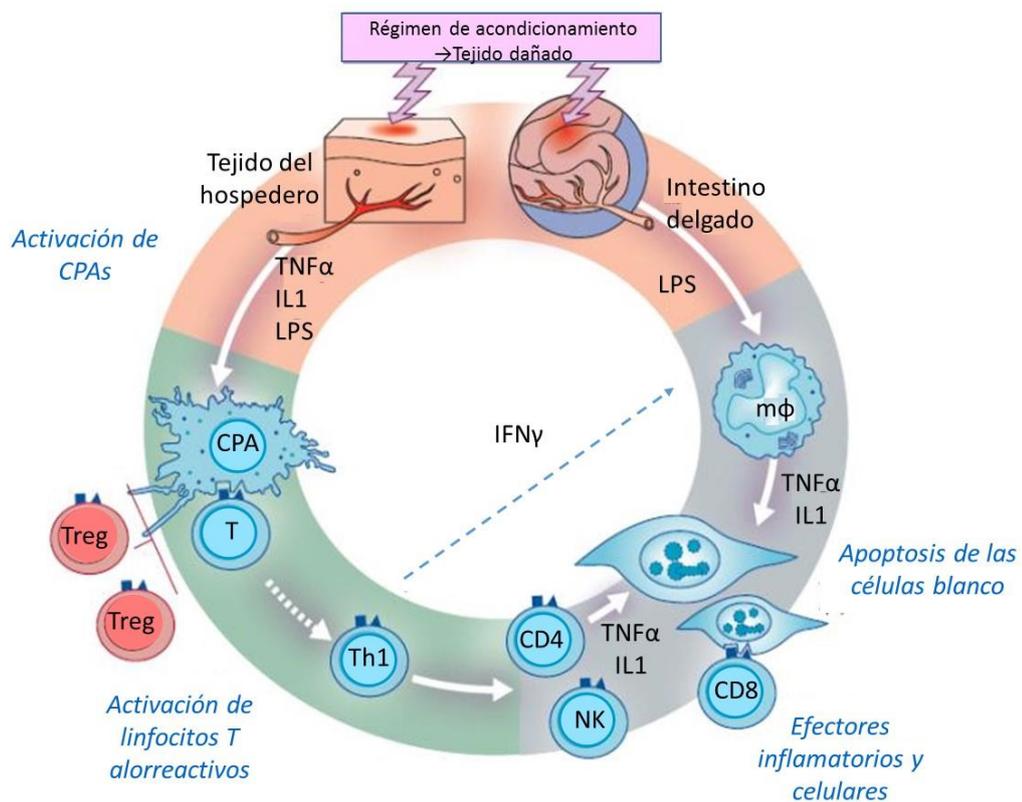


Fig 2. Inmunología de EICH

Modificado de Welniak, 2007

Células NK

El sistema inmune es clasificado de manera clásica en inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata se caracteriza por una variedad de células linfoides y mieloides que pueden ejercer una función efectora rápida a través de una limitada gama de receptores heredados por línea germinal. En contraste, la inmunidad adaptativa se caracteriza por la presencia de linfocitos T y B, que clonalmente expresan un amplio repertorio de receptores producto de recombinación somática específica, que son los receptores de células T (TCR) y el receptor de células B (BCR). Funcionalmente, las células T y B vírgenes se encuentran con los antígenos específicos en órganos linfoides especializados y experimentan un proceso de división celular y maduración antes de ejercer su función efectora (Cooper, 2001).

Las células NK son linfocitos granulares grandes que pertenecen al sistema inmune innato pero a diferencia de los linfocitos T o B de la respuesta inmune adaptativa o antígeno específica, las células NK no llevan a cabo el arreglo de genes del TCR o de inmunoglobulina y cuentan con una amplia variedad de receptores para reconocer a sus células blanco. Las células NK fueron originalmente descritas con base a su capacidad “natural” de lisar células blanco *in vitro*, un proceso conocido como “*Natural killing*”, son células efectoras del sistema inmune innato capaces de reconocer y destruir células blanco neoplásicas o infectadas por virus de manera espontánea, por lo que no requiere inmunización previa y el reconocimiento no se restringe a células blanco que expresen moléculas del MHC (Cooper, 2001).

Función de la célula NK

La función citotóxica de las células NK se puede presentar mediante tres vías A) Secreción de citocinas ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, etc). El interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$) es considerado la citocina prototipo de la célula NK y su producción estimula una respuesta Th1, activa a CPAs para sobreexpresar moléculas HLA de clase I, activar macrófagos para lisar a patógenos intracelulares, así como generar un efecto antiproliferativo de virus y células transformadas. B) Por medio de la liberación del contenido de sus gránulos vía perforina/granzima mediante exocitosis o C) Mediante la vía relacionada con el receptor de muerte (FasL, TRAIL), debido a la unión de estos receptores presentes en células NK con sus ligandos en células blanco (Li, 2002).

Receptores de la célula NK

Durante años se creyó que la acción de las células NK era regulada por mecanismos de tipo inhibitorio, por lo que la lisis de células blanco era considerado un defecto resultado de la ausencia de señales de tipo inhibitorio. El descubrimiento de los receptores de tipo activador expresados en las células NK ayudó al entendimiento de que la actividad citotóxica de las células NK es controlada al integrar señales estimuladoras o inhibitorias después de la interacción de una amplia gama de receptores en la superficie celular con sus respectivos ligandos en la célula blanco, por lo que la actividad de las células NK es ahora considerada en términos de un balance entre señales de tipo inhibitorio y activador. Las células NK se caracterizan por presentar un repertorio de receptores inhibitorios y activadores cuya función es asegurar la tolerancia a lo propio mientras combaten eficientemente infecciones virales y el desarrollo de células tumores (Li, 2002).

Las células NK detectan células infectadas o anormales a través de una variedad de receptores que detectan la pérdida de la expresión de las moléculas del HLA de clase I u otras señales celulares específicas independientes de las moléculas del MHC de clase I. La combinación de estas señales desencadena y modula las funciones efectoras de las células NK (Lo Monaco, 2011).

La citotoxicidad de estas células está determinada por un balance de señales producto del reconocimiento de “la pérdida de lo propio” y “la inducción de lo propio” en células blanco. El reconocimiento de la pérdida de lo propio ha sido extensamente estudiado e involucra la activación de las células NK por células de baja o ausente expresión de moléculas de MHC clase I que son ligandos de receptores de tipo inhibitorio. Los receptores de tipo inhibitorio son proteínas con motivos inmunorreceptores de inhibición basados en tirosina (ITIM) que a través del reclutamiento de fosfatasas bloquean la respuesta inmune, estos receptores inhibitorios incluyen a miembros de la familia de receptores KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) y al receptor CD94/NKG2A. En contraste, el reconocimiento de la “inducción de lo propio”, se lleva a cabo por receptores como NKG2D que reconoce proteínas propias expresadas en células infectadas o neotransformadas (Redelinghuys, 2011).

Familia de receptores NKG2

Esta familia de receptores se caracteriza por tener dominios extracelulares tipo lectina C y ser expresados como heterodímeros compuestos por una subunidad común (CD94) unida covalentemente a distintas cadenas codificadas por los genes de esta familia de receptores (Borrego, 2002).

La familia de receptores NKG2 está compuesta por cinco miembros denominados NKG2A/B, NKG2C, NKG2E, NKG2D y NKG2F. Estos receptores se encuentran codificados en el complejo que codifica para genes de células *Natural Killer* (NKC) localizado en el brazo corto del cromosoma 12 en particular la región 12p13.1 en humanos. Este es un *locus* que codifica una amplia cantidad de receptores ya sea de tipo inhibidor o activador originalmente identificados por su predominante expresión en células NK. Estos receptores juegan un papel crítico en la capacidad de las células NK para discriminar entre lo propio, la pérdida de lo propio y la inducción de lo propio regulando un fino balance entre la activación e inhibición de la célula NK (Borrego, 2002).

La evidencia sugiere que este *cluster* de genes surgió mediante mecanismos de duplicación de un gen ancestral común. Es probable que una duplicación inicial originó el gen NKG2A y un segundo gen que experimentó subsecuentes duplicaciones para resultar en NKG2F y finalmente en NKG2C y NKG2E, por lo que la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes de esta familia son muy similares. La secuencia difiere principalmente en la región que codifica para el segmento intracelular de las proteínas, lo que confiere diferentes propiedades de señalización. La secuencia de las regiones extracelulares de estas proteínas son altamente conservadas para proveer unión imparcial con la proteína CD94 (Borrego, 2002).

Receptores NKG2A y NKG2C

Los receptores NKG2A y NKG2C se presentan en la superficie celular en forma de heterodímeros junto con la molécula CD94 codificada dentro del mismo cromosoma. Ambos receptores tienen como ligando a la molécula HLA-E. Sin embargo, en el caso de NKG2A se trata de un receptor de tipo inhibidor que con dos motivos ITIM dentro de la región intracitoplasmática. Mientras que el receptor NKG2C, es un receptor de tipo activador que carece de regiones intracitoplasmáticas para la transducción de

señales al espacio intracelular por lo que se asocia con la molécula adaptadora DAP12 que presenta motivos inmunoreceptores basados en cinasas de tirosina (ITAM). NKG2A/CD94 inhibe la activación mediante la fosforilación de Vav1 (Lo Monaco, 2011).

Ligando del receptor NKG2A y NKG2C: HLA-E

El antígeno leucocitario humano E es una molécula de clase I no clásica blanco de células NK, linfocitos T citotóxicos y más recientemente se ha descrito que es reconocida por un subgrupo de linfocitos T CD8+ con fenotipo de memoria, llamados por algunos autores como CTLs-NK (Lo Monaco, 2011).

HLA-E es una molécula con bajo polimorfismo conformada por una cadena pesada unida a una cadena de β -2m que selectivamente une péptidos derivados de las secuencias líder de otras moléculas de clase I (de las moléculas clásicas HLA-A, -B, C y HLA-G) con ayuda de chaperones como los transportadores asociados con el procesamiento de antígenos (TAP) y tapasina. La molécula de HLA-E tiene cinco residuos de unión en las posiciones P2, P3, P6, P7 y P9, esto impone una restricción astringente para la secuencia de péptidos capaces de unirse a esta molécula. Durante la traslocación de las proteínas del HLA de clase I la secuencia señal es cortada por una peptidasa, esta ruptura causa que la parte amino hidrofílica sea liberada al citosol. Este oligopéptido hidrofílico, es procesado por el proteosoma resultando un péptido líder que es transportado al interior del retículo endoplásmico (RE) mediante los transportadores TAP y tapasina, para unirse a las moléculas de HLA-E y expresarse en la superficie celular. Por lo que la expresión de HLA-E, requiere la disponibilidad de péptidos capaces de unirse a estas moléculas en el compartimiento intracelular. La molécula de HLA-E funciona como un sensor para el monitoreo por parte de las células de la respuesta inmune a cerca del estado actual del proceso de síntesis de proteínas de histocompatibilidad, así como la vía de maduración de las moléculas de clase I (Iwaszko, 2011).

Aunque no es claro como la familia de receptores CD94-NKG2 interactúa con HLA-E, la asociación entre CD94 y NKG2 es crítica para la actividad biológica de esta familia. Los miembros de la familia CD94-NKG2 difieren en su afinidad por HLA-E, siendo más fuerte con el receptor NKG2A que con NKG2C (Iwaszko, 2011; Kaiser, 2008).

Receptor NKG2D

NKG2D es un receptor transmembranal tipo II perteneciente a la familia tipo lectina no dependiente de calcio con función activadora. Este receptor es expresado en la superficie celular como un homodímero unido por un puente disulfuro y es codificado por el gen KLRK1 (*killer cell lectin like receptor subfamily K, member 1*) que se encuentra dentro del NKC, el cual sólo tiene una homología del 20% al 30% en la secuencia de nucleótidos con otros miembros de la familia NKG2 (Burgess, 2008, Li, 2001) El receptor activador NKG2D es un potente inmunorreceptor que se expresa en las células NK, células NKT, linfocitos T $\gamma\delta^+$, linfocitos T CD8⁺ y en algunos subgrupos de células CD4⁺ (Li, 2001). La interacción NKG2D-ligando conduce directamente a la lisis de la célula blanco, así la inmunidad contra tumores y agentes microbianos es la función vital de estos receptores (Joyce, 2011, Champsaur, 2010; Burgess, 2008).

NKG2D tiene un dominio intracelular corto sin motivos de señalización por lo que se asocia con proteínas adaptadoras para la transducción de señales a través de residuos cargados en su dominio intracelular. La asociación con moléculas adaptadoras es importante tanto para la señalización como para la estabilidad del receptor en la superficie celular. Las moléculas adaptadoras son un tipo de proteínas transmembrana tipo I con residuos de ácido aspártico en la región transmembranal que interactúan con el residuo de arginina cargado positivamente en la región transmembranal de la proteína NKG2D. La traducción de la señal a través de DAP10 se lleva a cabo dado que el acoplamiento del receptor con su respectivos ligandos lo que permite la fosforilación de tirosina por parte de la familia de cinasas de tirosina src dentro del motivo Tyr-Ie-Asn-Met (YxxM) de DAP10, esto promueve la activación de vías de señalización. La activación de la vía PI3K ocurre a través de la unión y subsecuente activación de la subunidad p85 de PI3K por la tirosina fosforilada de DAP10 la cual se a su vez se encarga de la fosforilación de 4,5 bifosfato de fosfoinositol (PIP2) dando como resultado 3,4,5 trifosfato de fosfoinositol (PIP3), un segundo mensajero bioactivo. Una vez activada, la proteína PIP3 recluta diferentes moléculas efectoras como la cinasa 1 dependiente de fosfoinositol (PDK1), Akt (PKB) y GRB2/VAV1. El resultado final de la activación de GTPasas incluye la organización del citoesqueleto, la polarización de los gránulos y su liberación. La fosforilación de la molécula Akt también activa vías de supervivencia. Además la vía PI3K puede conducir a la activación de cinasas de serina treonina MEK y ERK (Burgess, 2008; Ullrich, 2013).

Cada homodímero del receptor NKG2D se ensambla en la superficie celular con dos dímeros de DAP10, formando por tanto una estructura hexamérica, lo cual probablemente sirve para reducir el umbral de los niveles de ligando requeridos para inducir la traducción de la señal (Burgess, 2008).

NKG2D media señales tanto activadoras como coestimuladoras. En células NK, la unión con sus respectivos ligandos es suficiente para desencadenar la activación celular, mientras que en los linfocitos CD8+ la interacción con los ligandos tiene una función coestimuladora. Las células T requieren dos estímulos para la activación; uno es provisto a través del TCR vía el reconocimiento de su respectivo complejo peptido-MHC y la segunda señal coestimuladora es provista por la molécula prototipo CD28. Debido a que DAP10 tiene un motivo YxxM, al igual que CD28, ha sido propuesto que este receptor tiene un rol coestimulador en linfocitos T CD8+. Es decir, la interacción de este receptor con sus ligandos no es suficiente para activar la lisis de la célula blanco en ausencia de acoplamiento de TCR, a menos que estas células hayan sido previamente activadas *in vitro* con IL-2 (Verneris, 2004, Burgess, 2008).

Aunque la señalización después del acoplamiento de NKG2D con sus ligandos no es suficiente para provocar la lisis de la célula blanco, recientemente se ha descrito que la interacción del TCR regula positivamente la actividad del promotor de DAP10. (López, 2008). Además, la interacción con NKG2D con sus respectivos ligandos induce la citotoxicidad de los linfocitos CD8 al estimular la formación de inmunosinapsis en ausencia de señalización por TCR. Por lo tanto, la inducción de sinapsis inmunológica por parte de este receptor disminuye el umbral de activación de las células T. Esto puede tener implicaciones en la patogénesis de autoinmunidad. De hecho, la regulación inadecuada puede causar la estimulación de células NKG2D+ auto-reactivas promoviendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, se ha correlacionado la severidad de artritis reumatoide con la presencia de células T CD4+ NKG2D+ en sangre periférica y tejido sinovial; células normalmente ausentes en individuos sanos (Groh, 2003). Resultados similares han sido reportados en enfermedad de Crohn donde este subgrupo celular se ha reportado elevado en la lámina propia (Allez, 2007), así como en pacientes con infección por CMV (Saez, 2006).

Ligandos de NKG2D

El receptor NKG2D tiene como ligandos a proteínas parecidas a las moléculas del MHC de clase I. Existen dos familias de ligandos para este receptor; los ligandos MIC (*MHC class-I-chain-related protein*), codificados dentro de la región del MHC, que son proteínas de una sola cadena parecidas a las moléculas del MHC-I con dos miembros MICA y MICB, y una segunda familia de proteínas también parecidas al MHC de clase I, las ULBPs también conocidas como transcritos tempranos de ácido retinoico (Borrego, 2002).

Las moléculas de MICA y MICB son altamente glicosiladas y tienen baja homología en su secuencia a las moléculas de HLA (18 al 30%). Similar a las moléculas del MHC, poseen dos dominios en la plataforma α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) con una cadena de ocho hojas β plegadas, además de un dominio $\alpha 3$ y una región corta citoplasmática. A diferencia de las moléculas de histocompatibilidad, las moléculas de MIC no se asocian con $\beta 2$ -microglobulina y no unen péptidos debido a que estas moléculas carecen de los residuos críticos en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ mediante los cuales se lleva a cabo la interacción péptido-MHC (Joyce, 2011). Las proteínas de MIC son altamente polimórficas, de hecho a la fecha más de 70 secuencias de MICA y 30 secuencias de MICB se han reportado (Steven GE Marsh, Anthony Nolan Research Institute, 2013).

Las proteínas ULBP son codificadas dentro del cromosoma 6 pero fuera de la región del MHC. Hasta el momento, han sido identificados seis genes de esta familia de proteínas ULBP 1-6, estas moléculas presentan de un 55 a 60% de homología entre su secuencia de aminoácidos. Similar a MIC, estas moléculas no se unen a $\beta 2$ -microglobulina ni presentan péptidos antigénicos (Groh, 1996). A diferencia de las moléculas de MIC estas proteínas carecen de un dominio $\alpha 3$ y se unen a la membrana celular a través de dominios de glucofosfatidilinositol (GPI). La mayoría de las proteínas ULBPs se encuentran sobre balsas de lípidos (sitios de la membrana ricos en esfingolípidos y colesterol), regiones que se polarizan al sitio de interacción de la célula NK y la célula blanco lo cual incrementa la avidéz de la interacción con NKG2D (Eagle, 2007).

La promiscuidad de unión a un solo receptor de estos ligandos enfatiza su importancia evolucionaria y funcional. La hipótesis más ampliamente aceptada explica que la existencia de múltiples ligandos se debe a que estos han aparecido durante la

evolución del sistema inmunológico en respuesta a la presión de selección ejercida por la patogénesis del cáncer. El análisis de las dos familias de ligandos ha revelado propiedades funcionales en común, estas características representan ejemplos de evolución convergente presumiblemente por razones de eficiencia máxima del reconocimiento inmunológico (Eagle, 2007).

El homodímero de NKG2D se une a los dominios $\alpha 1/\alpha 2$ de sus ligandos, la unión es estabilizada por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Los estudios de estructura de NKG2D en asociación con sus ligandos revelan la constante de disociación de estas interacciones son uno o dos órdenes de magnitud más grandes que la unión TCR-ligando. Ambos monómeros de NKG2D conforman una superficie cóncava que es complementaria a la superficie convexa de sus ligandos. Cabe destacar que en esta unión ligando-receptor diferentes residuos están involucrados con la interacción con cada ligando. Esta plasticidad en la interacción NKG2D/NKG2DL permite que el receptor reconozca un gran número de diversas moléculas en ausencia de una modificación conformacional importante después de la unión con el ligando (Fernandez, 2012).

Se sabe muy poco acerca de los mecanismos que regulan la expresión de MIC y ULBP en condiciones de daño celular tales como la transformación, la infección, inhibición de proteosoma, choque térmico o estrés genotóxico. La regulación y expresión de estos ligandos difiere sustancialmente dependiendo del tipo celular y/o del estado metabólico en células blanco sugiriendo que la expresión de la mayoría de estos ligandos es un proceso sumamente controlado. Dentro de los factores que regulan la expresión de estos ligandos, se ha sido propuesto que el factor nuclear κB (NF- κB) es importante en la expresión de MICA, ya que hay un sitio de unión para NF- κB en el intrón 1 del gen de MIC. Además, la región promotora para MICB contiene sitios de unión para elementos de choque térmico (HSE), los cuales son inductores transcripcionales prototipo de los genes de la familia de proteínas de choque térmico 70 (HSP70), la activación de estos sitios conduce a la activación transcripcional bajo estrés. Estudios recientes, han provisto información de que cMyc también está involucrado en la regulación de la expresión de los ligandos MIC en un modelo murino sugiriendo que la regulación de estos ligandos depende de un mecanismo intrínseco de sensado de la transformación oncogénica (Unni, 2008). En lo que respecta a procesos infecciosos, la activación transcripcional del gen de MIC por la infección por CMV es mediado por el

gen inmediato temprano viral (IE1 o IE2). Este modelo de activación involucra la remodelación de cromatina mediante la acetilación de histonas por el desplazamiento de histonas deacetilasas, siendo la acetilación de estas proteínas uno de los principales mecanismos inductores de expresión (Skov, 2005).

La activación crónica de la respuesta de daño al DNA inducida por la radiación ionizante o agentes alquilantes también induce la expresión de MIC (Gasser, 2005). La actividad crónica de la respuesta de daño a DNA puede iniciar la expresión constitutiva en células tumorales o infectadas. Por tanto, el daño celular es blanco de un nivel adicional de control de calidad el cual involucra el inmuno-reconocimiento, un mecanismo que impide la evasión del sistema inmunológico y la progresión de la enfermedad (López, 2008).

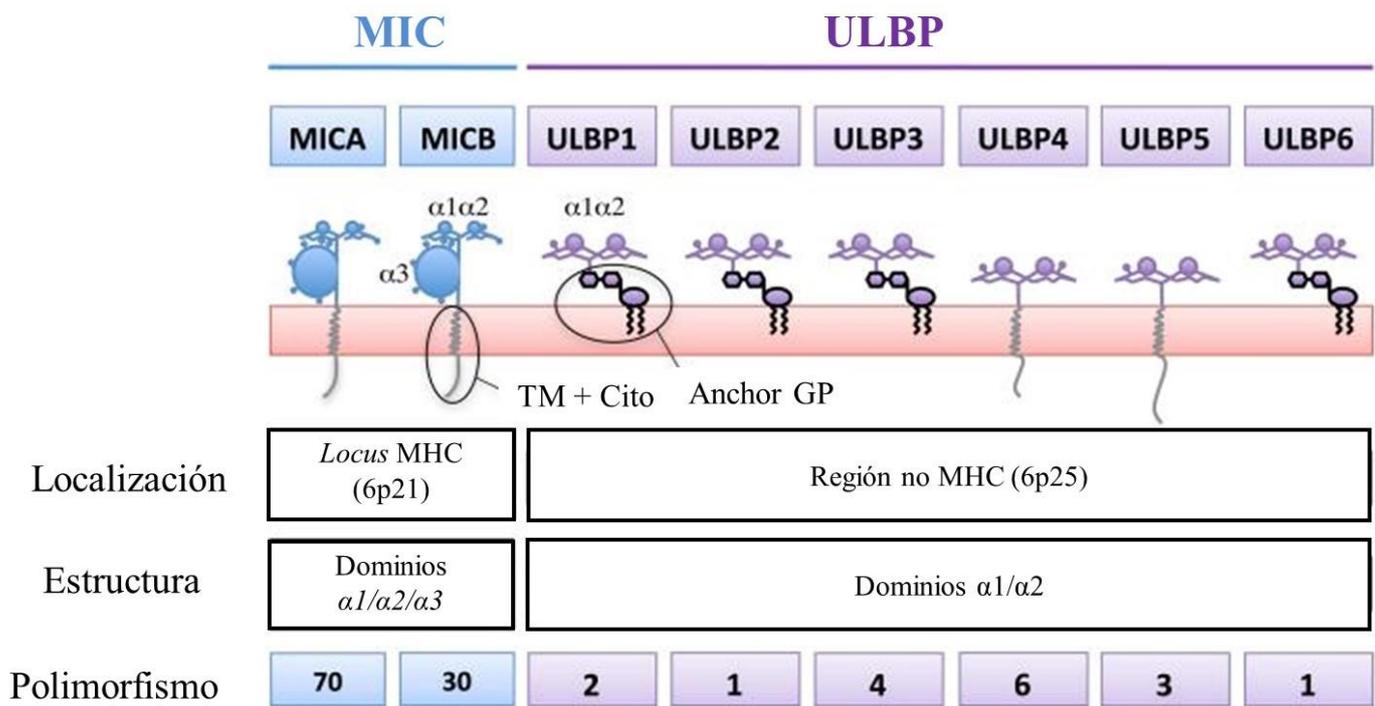


Fig 3. Familias génicas de ligandos de NKG2D: MIC y ULBP.

Modificado de Fernández, 2012

Receptores NKG2 y TCPH

Los genes que codifican para la familia de receptores NKG2 se encuentran localizados dentro de una región de 270Kb con alto desequilibrio de ligamiento en el brazo corto del cromosoma 12 en la región 13.2-12.3 que codifica para el complejo “*Natural Killer*”. Se ha reportado que la actividad citotóxica de la célula NK y los linfocitos CD8+, se define de acuerdo a la presencia de SNPs dentro de esta región del cromosoma. En estos términos, se presentan dos haplotipos. El primero denominado *hb1* que se caracteriza por la presencia de cinco SNPs de los genes NKG2D (C17288G, A7374G y G5326A), NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G) y NKG2A (C-798G). Mientras que el segundo haplotipo denominado *hb2* está formado de dos SNPs del gen NKG2D (A7374G y G5326A). Tanto el haplotipo hb-1 como el hb-2 generan dos haplotipos diferentes con base a su actividad citotóxica, uno de baja (LNK) y el otro de alta (HNK) actividad, que se conocen como LNK1, LNK2, HNK1 y HNK2 respectivamente (Hayashi, 2006). Interesantemente, se observó que el haplotipo de baja citotoxicidad (LNK1) se encuentra asociado al desarrollo de cáncer colorectal en población japonesa (Furue, 2008).

En lo que respecta al TCPH, en pacientes trasplante alogénico de donador no relacionado, muestran una mayor sobrevida asociada a la presencia del haplotipo de alta citotoxicidad (HNK1) (Espinoza, 2009). Esto sugiere que los polimorfismos de esta familia de receptores afectan el pronóstico posterior al TCPH, aunado a la discrepancia de los genes HLA entre el binomio donador-receptor. Además, recientemente en población japonesa, la presencia de este haplotipo de alta citotoxicidad se asocia con mayor expresión del receptor activador NKG2D en células NK y CD8+ (Imai, 2012).

Por lo anterior, sería muy interesante estudiar la participación de los polimorfismos de la familia de receptores NKG2 y sus ligandos con la aparición de aloreacciones postrasplante que originan el desarrollo de EICH.

Planteamiento del problema

El principal riesgo del TCPH es la EICH, la cual se presenta en más del 60% de los pacientes en los que se realiza el trasplante a pesar de poseer HLA compatibles con sus donadores. En esta reacción inmunológica participan como efectores células aloreactivas. Se ha descrito previamente que las células NK pueden clasificarse de acuerdo a su capacidad citotóxica por la presencia de siete SNPs dentro del complejo NKC, que codifica para los receptores de la familia NKG2.

Por lo anterior, la pregunta de investigación que se plantea es: ¿Existe asociación entre los polimorfismos de un solo nucleótido de la familia de receptores NKG2 con el desarrollo de la enfermedad injerto contra hospedero?

Hipótesis

Existe asociación entre los polimorfismos de un solo nucleótido de la familia de receptores NKG2, con el desarrollo de la enfermedad injerto contra hospedero.

Objetivos

General

Identificar si existe asociación entre los polimorfismos de un solo nucleótido de la familia de receptores NKG2 con el desarrollo de la enfermedad injerto contra hospedero.

Particulares

- Estudiar los SNPs de los genes NKG2A (C-798G), NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G) y NKG2D (C17288G, A7374G y G5326A) en el grupo control.
- Estudiar los SNPs anteriormente mencionados de los genes NKG2A, NKG2F y NKG2D en el donador y el receptor pretrasplante.
- Analizar los SNPs anteriormente mencionados de los genes NKG2A, NKG2F y NKG2D en el paciente postrasplante sin desarrollo de EICH, así como con EICH agudo y/o crónico.
- Determinar la expresión de los genes NKG2D y MIC en los pacientes postrasplante.

Diseño experimental

Población de estudio

Pacientes

Nuestra población de estudio fueron pacientes adultos que presenten EICH antes y después de 100 días del TCPH. Se estudiaron 55 binomios mestizos mexicanos (55 receptores con leucemia y 55 donadores sanos). El tamaño de muestra se calculó con respecto a la frecuencia del alelo menor (MAF) reportada en la base de datos NCBI, frecuencia mayor al 10% con un razón de momios (RM) de 3.0, confianza de 95%, poder de 80% y α de 0.05.

Criterios de inclusión

- Tener 18 años de edad o más al momento del diagnóstico
- Contar con un donador HLA compatible
- Ser mexicano con ascendencia mínima de dos generaciones
- Pacientes sometidos a TCPH alogénico

Criterios de exclusión

- Pacientes con alguna enfermedad autoinmune, diabetes u otro tipo de cáncer
- Pacientes con trasplante autólogo
- Pacientes con trasplante de cordón umbilical

Controles

En este estudio se incluyó un grupo control de 235 individuos.

Criterios de inclusión

- Ser pareados en edad y género con el grupo de pacientes pretrasplante
- Ser mexicano con ascendencia de dos o más generaciones
- Ser clínicamente sanos

Criterios de exclusión

- Tener relación consanguínea con el grupo de pacientes pretrasplante o con algún otro miembro del grupo control

Criterios de eliminación de muestras

- Muestra insuficiente de sangre de pacientes pretrasplante, del binomio donador-receptor, del receptor postrasplante y del grupo control
- DNA o RNA de baja concentración o degradado de alguna de las muestras colectadas
- Muestra con resultados incompletos para el análisis de discriminación alélica

Variables

Variable independiente

- SNPs de NKG2D (C17288G, A7374G y G5326A)
- SNPs de NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G)
- SNPs de NKG2A (C-798G)

Variable dependiente

- EICH

Metodología

Material biológico

Muestras de DNA genómico y RNA obtenidas mediante la microtécnica de *salting out* (Miller, 1988) y por la técnica de trizol respectivamente a partir de células mononucleares de sangre periférica. Posterior a la extracción se determinó la concentración espectrofotométricamente, así como la integridad por electroforesis en gel de agarosa.

Toma de muestra

La muestra de sangre periférica se obtuvo por punción venosa tanto de los individuos del grupo control como del binomio donador-receptor (pretrasplante y posterior a los 180 días postrasplante). Se obtuvo un volumen de 10mL de sangre por individuo en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante.

Síntesis de cDNA

Se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante la técnica de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) a partir del RNA total siguiendo las especificaciones de un kit comercial (*SuperScriptTM II Reverse Transcriptase System*, Invitrogene, California, USA).

Genotipificación por PCR en tiempo real

La tipificación de los polimorfismos de los genes NKG2A (C-798G), NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G), NKG2D (C17288G, A7374G y G5326A) fue realizada mediante la técnica de PCR en tiempo real usando sondas *TaqMan*. Las condiciones de reacción para 20µl son: 25ng de DNA, 1X de *TaqMan Genotyping Master Mix* (*AmpliTaq Gold^R DNA polimerasa*) y 1X *Taqman Genotyping Assay*. En cuanto a las condiciones de amplificación fueron un ciclo inicial de *Hot Start* a 95°C por 10min, seguido por 30 ciclos que constan de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos,

anillamiento y elongación por 1min a 60°C. La reacción se concluye con un ciclo final de amplificación a 60°C por 30 segundos más.

Fundamento: Los ensayos de genotipificación por PCR en tiempo real detectan variantes de extensión de un solo nucleótido. La presencia de dos sondas en cada reacción permite identificar dos posibles variantes de un SNP en una secuencia blanco. Cada una de las sondas es específica para un alelo y se encuentra marcada en el extremo 5' con un fluorocromo (reportero) y en el extremo 3' con un apagador no fluorescente. La sonda específica para el alelo ancestral se encuentra marcada en el extremo 5' con un fluorocromo (VIC^R) mientras que para el polimorfismo con otro (FAM^R). Cada sonda *TaqMan* se alinea específicamente a su secuencia complementaria entre el sitio de unión del iniciador 5' y el 3'. Cuando en este oligonucleótido está intacto, la proximidad del apagador le permite absorber la fluorescencia emitida por el reportero, por lo que la fluorescencia total observada es igual a cero, este fenómeno se conoce como Förster o *Fluorescent Resonant Energy Transfer* (FRET). Posterior al alineamiento de los iniciadores, la enzima DNA polimerasa inicia la extensión. Cuando encuentra la sonda, por su actividad 5' exonucleasa, la polimerasa rompe el oligonucleótido que hibrida en la región blanco donde se encuentra el SNP. La ruptura de la sonda separa el apagador del reportero, resultando en un incremento de fluorescencia total del sistema, lo cual es detectado por el equipo. Por tanto, las señales de fluorescencia generadas durante la amplificación de la PCR indican los alelos que están presentes en cada una de las muestras.

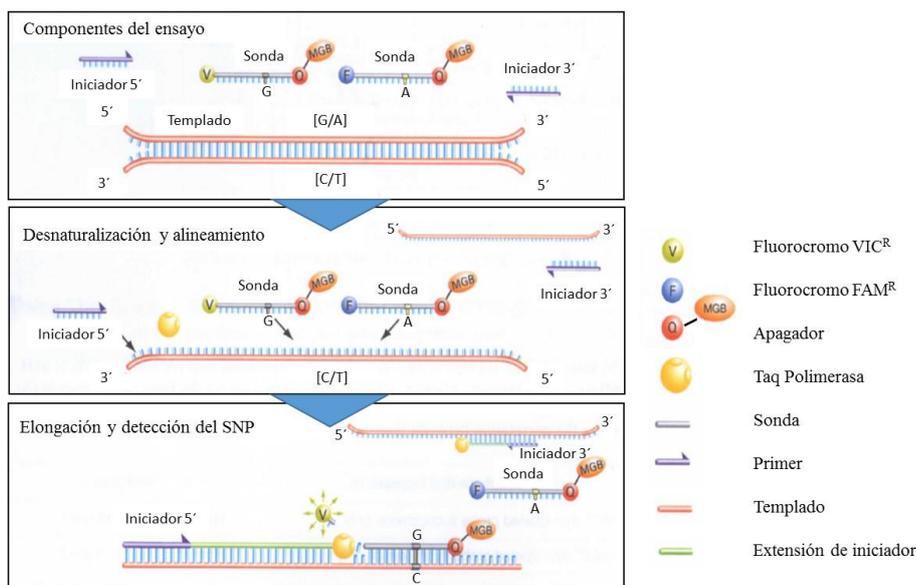


Fig 4. Representación esquemática del fundamento de discriminación alélica por PCR en tiempo real

Determinación de expresión génica relativa por PCR en tiempo real

Mediante la técnica de PCR en tiempo real se determinó la expresión génica relativa del gen NKG2D y su ligando MIC. Para esta determinación se realizó el diseño sondas específicas para detección de RNA mensajero, en el caso de MIC se diseñaron iniciadores universales para todos los alelos de MIC. Este experimento permite identificar cambios en la expresión de genes mediante el uso de sondas de hidrólisis *TaqMan* marcadas con un fluorocromo (FAM^R), usando como control de carga el gen constitutivo GAPDH y como calibrador del sistema el grupo de donadores.

Diagrama de flujo

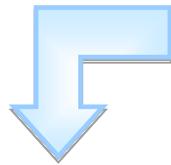
PRETRASPLANTE

POSTRASPLANTE

Donador/Receptor



Receptor



Extracción
RNA y DNA



Expresión génica
relativa
(NKG2D y MIC)

Discriminación alélica

NKG2A

- C-798G

NKG2D

- C17288G
- A7374G
- G5326A

NKG2F

- T1413C
- C1091G
- T-4068A



Análisis
estadístico

Resultados

Población de estudio

Tabla 1. Poblaciones de estudio

Grupo	N	Edad promedio	Relación Masculino/Femenino
Controles	235	34.5	1.61
Pacientes	55	34.2	1.6
Donadores	55	34.7	1.59

Tabla 2. Características de los binomios donador-receptor

	Número	Porcentaje
Compatibilidad	52	100
Hermanos (Compatibilidad HLA 6/6)	50	96.15
Hermanos (Compatibilidad HLA 5/6)	2	3.85
Genero D/R		
M/M	21	40.38
M/F	11	21.15
F/M	11	21.15
F/F	9	17.31
Edad Receptor		
18 a 20	9	17.31
21 a 30	13	25.00
31 a 40	17	32.69
41 a 50	11	21.15
51 a 60	2	3.85
Edad Donador		
18 a 20	9	17.31
20 a 30	8	15.38
30 a 40	20	38.46
41 a 50	12	23.08
51 a 60	3	5.77
Diagnóstico		
Leucemia Mieloide Aguda	24	46.15
Leucemia Mieloide Crónica	3	5.77
Leucemia Linfoide Aguda	14	26.92
Leucemia Linfoide Crónica	1	1.92
Leucemia Bifenotípica	2	3.85
Anemia Aplásica	5	9.62
Síndrome Mielodisplásico	5	9.62
Inmunodeficiencia	1	1.92
EICH		
Sin	10	19.23
EICH agudo	9	17.31
EICH crónico	33	63.46
Condición actual		
Injerto estable/Sin EICH	3	5.77
Injerto estable/EICH quiescente	23	44.23
Injerto estable/EICH activo	8	15.38
Recaída	9	17.31
Decesos por infecciones	9	17.31

Controles

Alelos y genotipos

En la literatura no existen reportes de la frecuencia de SNPs de los genes NKG2A (C-798G), NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G), así como del gen NKG2D (C17288G, A7374G y G5326A). Por tal motivo, se realizó la tipificación de estos polimorfismos en un nuestro grupo control de 235 individuos clínicamente sanos, comparables en edad y género con el grupo de pacientes pretrasplante con la finalidad de conocer las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs por estudiar en el presente trabajo (Tabla 1). Los resultados de las frecuencias determinadas en el grupo control se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Frecuencias de los polimorfismos de un solo nucleótido en estudio en el grupo control

		C-798G				T-4068A		
			n	Frec			n	Frec
NKG2A	Alelo	C	217	(0.46)	Alelo	T	295	(0.63)
		G	253	(0.54)		A	175	(0.37)
	Genotipo	C C	55	(0.23)	Genotipo	T T	91	(0.39)
		C G	107	(0.46)		T A	113	(0.48)
		G G	73	(0.31)		A A	31	(0.13)
			C17288G		NKG2F	T1413C		
Alelo	G	181	(0.39)	Alelo		C	289	(0.61)
	C	289	(0.61)			T	181	(0.39)
Genotipo	C C	91	(0.39)	Genotipo		C C	87	(0.37)
	C G	107	(0.45)			C T	115	(0.49)
	G G	37	(0.16)			T T	33	(0.14)
		A7374G				C1091G		
NKG2D	Alelo	G	429	(0.91)	Alelo	C	184	(0.39)
		A	41	(0.09)		G	286	(0.61)
	Genotipo	G G	195	(0.83)	Genotipo	C C	36	(0.15)
		G A	39	(0.17)		C G	112	(0.48)
		A A	1	(0.00)		G G	87	(0.37)
			G5326A					
Alelo	G	432	(0.92)	Alelo	G	432	(0.92)	
	A	38	(0.08)		A	38	(0.08)	
Genotipo	G G	198	(0.84)	Genotipo	G G	198	(0.84)	
	G A	36	(0.16)		G A	36	(0.16)	
	A A	1	(0.00)		A A	1	(0.00)	

Haplotipos

Los resultados también fueron analizados mediante la determinación del desequilibrio de ligamiento para la formación de haplotipos con el uso programa de Haploview versión 4.2. En la figura 2 se muestra el Plot de desequilibrio de ligamiento sobre los SNPs estudiados en el grupo control. Se identificaron dos haplotipos; los polimorfismos C17288G, T-4068A, T1413C y C1091G ($r^2 \geq 80$) forman el haplotipo *hb1* reportado previamente (Hayashi, 2006), pero no el SNP C-798G del gen NKG2A como fue descrito. El segundo haplotipo está conformado por los SNPs A7374G y G5326A ($r^2 \geq 80$), lo que coincide con el estudio de Hayashi *et al*, 2006.

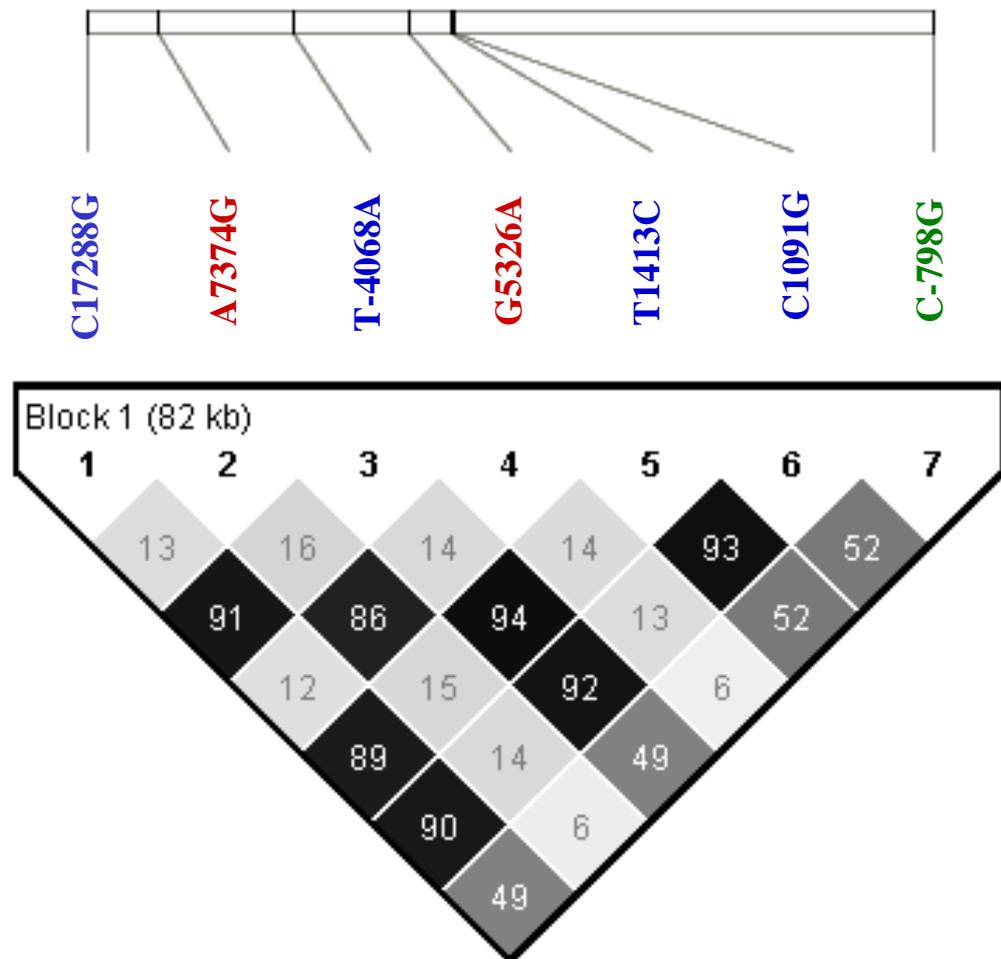


Fig 5. Plot de desequilibrio de ligamiento

En la parte superior de la figura se señala los polimorfismos estudiados. Cada rombo muestra el valor de r^2 que corresponde al par de SNPs que forman el vértice en la parte inferior del rombo.

En la parte superior de la Figura 6 se muestra la frecuencia de haplotipos formados por los SNPs C17288G, T-4068A, T1413C y C1091G (*hb1v*). Debido a que en estos haplotipos no se encuentra el SNP C-798G del gen NKG2A como se reportó anteriormente (Hayashi, 2006), los cuales denominaremos como variantes (HNK1v y LNK1v). Además, se encontraron dos haplotipos adicionales, los cuales se nombraron NK1a y NK1b.

En la parte inferior de la figura se observan las frecuencias de haplotipos de alelos conformados por los SNPs A7374G y G5326A (NKG2D). Adicional a dichos haplotipos HNK2 y LNK2 previamente reportados, se evidenció un haplotipo de menor frecuencia denominado NK2a.

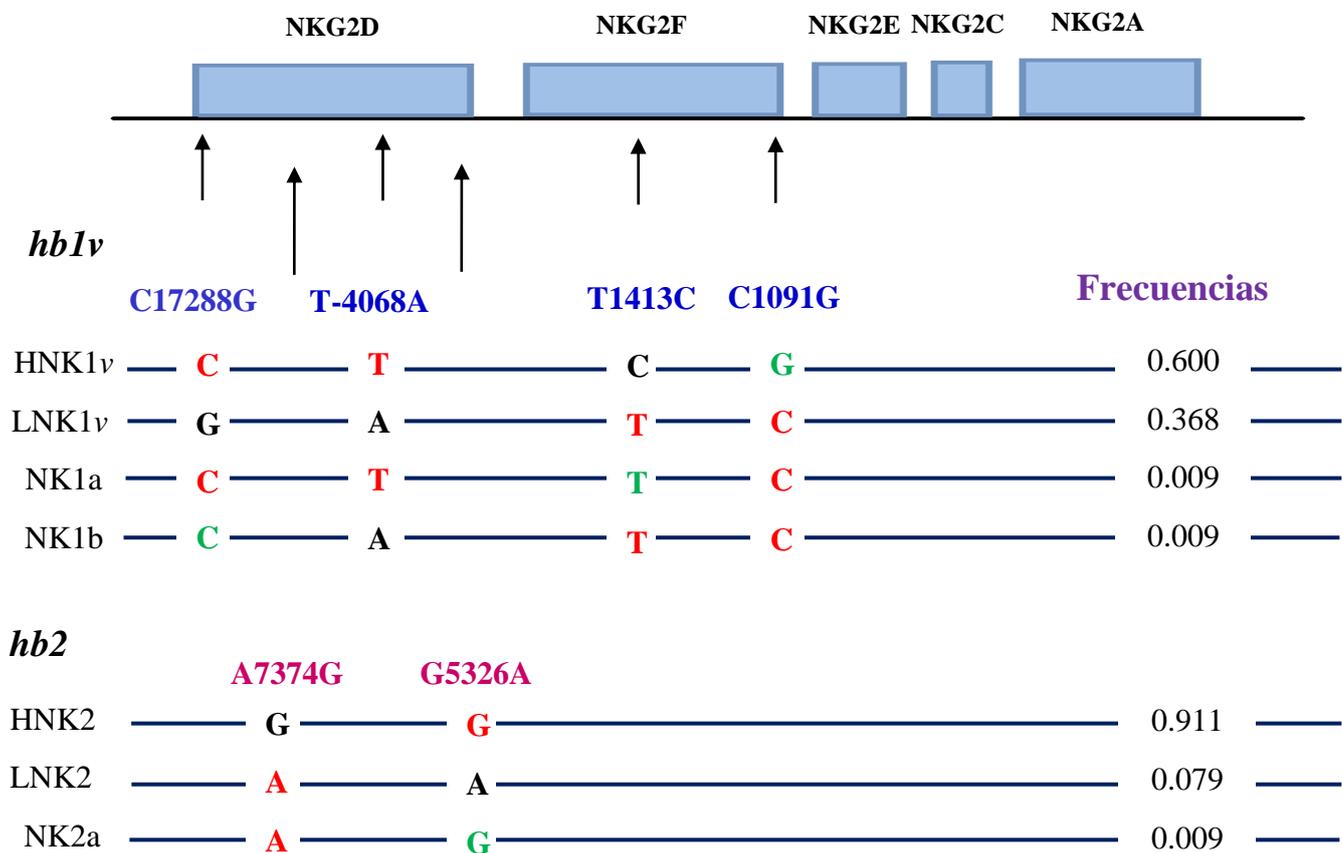


Fig 6. Frecuencias de los haplotipos en el grupo control

En rojo se muestran los alelos ancestrales, mientras que en negro los polimorfismos. En verde se señalan los alelos que no han sido reportados en la formación del haplotipo.

Tabla 4. Frecuencias de los haplotipos en el grupo control

	Haplotipo	Controles n=235
<i>hb1v</i>		
HNK1v/HNK1v	GATC/GATC	30 (0.128)
HNK1v/LNK1v	GATC/CTCG	105 (0.447)
LNK1v/LNK1v	CTCG/CTCG	86 (0.366)
NK1a/NK1a	CTTC/CTTC	5 (0.021)
NK1a/NK1b	CTTC/CATC	4(0.017)
NK1b/NK1b	CATC/CATC	5 (0.021)
<i>hb2</i>		
HNK2/HNK2	GG/GG	194 (0.825)
HNK2/LNK2	GG/AA	35 (0.149)
LNK2/LNK2	AA/AA	1 (0.004)
NK2a/NK2a	AG/AG	5(0.021)

En la Tabla 4 se muestra la frecuencia de la combinación de haplotipos para los individuos del grupo control. Como se puede observar dentro de *hb1v*, el grupo más frecuente es de individuos heterocigotos HNK1v/LNK1v (0.447) seguido por el grupo de homocigotos a la variante de baja citotoxicidad (LNK1v/LNK1v) en una frecuencia del 0.366.

Para *hb2*, el grupo homocigoto HNK2/HNK2 es el más frecuente (0.825), mientras que en una frecuencia de 0.149 los heterocigotos HNK2/LNK2.

Pretrasplante

Alelos y genotipos

Las células NK llevan a cabo la inmunovigilancia contra cáncer mediante el reconocimiento de ligandos de estrés celular (MIC) en células transformadas. Dado que los siete SNPs dentro del NKC han sido asociados con la capacidad citotóxica de la célula NK, se realizó la discriminación alélica en el grupo de pacientes pretrasplante (Tabla 5). En comparación con el grupo control, en este grupo de pacientes se muestra una menor frecuencia del alelo G y del genotipo GG del polimorfismo A7374G del gen NKG2D ($p < 0.05$).

Tabla 5. Frecuencias de los polimorfismos de un solo nucleótido en estudio en el grupo de pacientes pretrasplante

		C-798G		n	Frec			T-4068A		n	Frec
NKG2A	Alelo	C		52	(0.47)	Alelo	T		67	(0.61)	
		G		58	(0.53)		A		43	(0.39)	
	Genotipo	C C		13	(0.24)	Genotipo	T T		21	(0.38)	
		C G		26	(0.47)		T A		25	(0.46)	
		G G		16	(0.29)		A A		9	(0.16)	
			C17288G				NKG2F	T1413C			
Alelo	G		41	(0.37)	Alelo	C			66	(0.60)	
	C		69	(0.63)		T			44	(0.40)	
Genotipo	C C		24	(0.44)	Genotipo	C C			20	+(0.37)	
	C G		21	(0.38)		C T			26	(0.47)	
	G G		10	(0.18)		T T			9	(0.16)	
		A7374G						C1091G			
NKG2D	Alelo	G		93	(0.85)*	Alelo	C		42	(0.38)	
		A		17	(0.15)		G		68	(0.62)	
	Genotipo	G G		39	(0.71)**	Genotipo	C C		9	(0.16)	
		G A		15	(0.27)		C G		24	(0.44)	
		A A		1	(0.02)		G G		22	(0.40)	
		G5326A									
Alelo	G		98	(0.89)	Alelo	A		121	(0.11)		
	A		121	(0.11)		Genotipo	G G		44	(0.80)	
Genotipo	G A		10	(0.18)	G A			10	(0.18)		
	A A		1	(0.02)	A A			1	(0.02)		

* RM 0.5228 (IC 95%: 0.2845-0.9607), $p < 0.05$, p corregida por Bonferroni > 0.05

**RM 0.5000 (IC 95%: 0.2548-0.9812), $p < 0.05$, p corregida por Bonferroni > 0.05

Haplotipos

Con respecto a la frecuencia de haplotipos, en comparación con el grupo control el haplotipo HNK2 es menos frecuente (0.845 *versus* 0.911). En contraste, el haplotipo NK2a es más frecuente en el grupo de pacientes (0.045 *versus* 0.009), ambas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias de haplotipos pretrasplante

Haplotipos	Frecuencia n=55
<i>hb1v</i>	
HNK1v	63 (0.572)
LNK1v	38 (0.345)
NK1a	2 (0.018)
NK1b	2 (0.018)
<i>hb2</i>	
HNK2	93 (0.845)*
LNK2	12 (0.109)
NK2a	5 (0.045)**

* RM 0.5400 (IC 95%: 0.2900-0.9800), $p < 0.05$, p corregida por Bonferroni > 0.05

**RM 5.5500 (IC 95%: 1.4600-21.020), $p < 0.05$, p corregida por Bonferroni < 0.05

Tabla 7. Frecuencias de la combinación de haplotipos pretrasplante

	Haplotipo	Frecuencia n=55
<i>hb1v</i>		
HNK1v/HNK1v	GATC/GATC	8 (0.145)
HNK1v/LNK1v	GATC/CTCG	20 (0.364)
LNK1v/LNK1v	CTCG/CTCG	19 (0.345)
NK1a/NK1a	CTTC/CTTC	3 (0.054)
NK1a/NK1b	CTTC/CATC	2 (0.036)
NK1b/NK1b	CATC/CATC	3 (0.054)
<i>hb2</i>		
HNK2/HNK2	GG/GG	39 (0.709)
HNK2/LNK2	GG/AA	10 (0.182)
LNK2/LNK2	AA/AA	5 (0.090)*
NK2a/NK2a	AG/AG	1 (0.018)

* RM 23.400 (IC 95%: 2.6740-204.80), $p < 0.05$, p corregida por Bonferroni < 0.05

En la Tabla 7 se pueden observar las frecuencias de los individuos homocigotos o heterocigotos para los diferentes haplotipos en el grupo de pacientes pretrasplante. En comparación con el grupo control, la frecuencia de los individuos homocigotos para LNK2/LNK2 es mayor (0.09 *versus* 0.004) $p < 0.05$.

De los resultados en las Tablas 6 y 7 el haplotipo HNK2 correlaciona con protección para el estado pretrasplante, mientras que el haplotipo LNK2 y homocigotos para este haplotipo (LNK2/LNK2) son de riesgo para la enfermedad.

Para el desarrollo de un análisis más detallado de dicha asociación sobre el grupo pretrasplante, se estratificó el grupo de pacientes entre los dos grupos de pacientes más frecuentes, LMA (24 pacientes) y LLA (14 pacientes) (Tabla 2). Al estratificar, nuestro tamaño de muestra se reduce evitando establecer asociación estadísticamente significativa, no obstante se puede observar una tendencia de asociación con SNP A7374G del gen NKG2D.

Postrasplante

Alelos y genotipos

Se determinaron las frecuencias de los polimorfismos analizados en este estudio para el grupo de pacientes postrasplante. En la Tabla 8, se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de estos polimorfismos en el grupo postrasplante *versus* el grupo de donadores.

Tabla 8. Frecuencias de los haplotipos en el grupo de donadores versus postrasplante

		Postrasplante		Donador		
		n	Frec	n	Frec	
NKG2A	C-798G					
	Alelo	C	51	(0.46)	51	(0.46)
		G	59	(0.54)	59	(0.54)
	Genotipo	C C	12	(0.22)	12	(0.22)
		C G	27	(0.49)	27	(0.49)
		G G	16	(0.29)	16	(0.29)
NKG2F	T-4068A					
	Alelo	T	69	(0.63)	69	(0.63)
		A	41	(0.37)	41	(0.37)
	Genotipo	T T	20	(0.36)	20	(0.36)
		T A	29	(0.53)	29	(0.53)
		A A	6	(0.11)	6	(0.11)
NKG2D	C17288G					
	Alelo	G	41	(0.37)	41	(0.37)
		C	69	(0.63)	69	(0.63)
	Genotipo	C C	20	(0.36)	20	(0.36)
		C G	29	(0.53)	29	(0.53)
		G G	6	(0.11)	6	(0.11)
NKG2D	A7374G					
	Alelo	G	103	(0.94)	103	(0.94)
		A	7	(0.06)	7	(0.06)
	Genotipo	G G	48	(0.87)	48	(0.87)
		G A	7	(0.13)	7	(0.13)
		A A	0	(0.00)	0	(0.00)
NKG2F	T1413C					
	Alelo	C	67	(0.61)	67	(0.61)
		T	43	(0.39)	43	(0.39)
	Genotipo	C C	18	(0.33)	18	(0.33)
		C T	31	(0.56)	31	(0.56)
		T T	6	(0.11)	6	(0.11)
NKG2D	G5326A					
	Alelo	G	102	(0.93)	102	(0.93)
		A	8	(0.07)	8	(0.07)
	Genotipo	G G	47	(0.85)	47	(0.85)
		G A	8	(0.15)	8	(0.15)
		A A	0	(0.00)	0	(0.00)
NKG2D	C1091G					
	Alelo	C	42	(0.38)	42	(0.38)
		G	68	(0.62)	68	(0.62)
	Genotipo	C C	6	(0.11)	6	(0.11)
		C G	30	(0.54)	30	(0.54)
		G G	19	(0.35)	19	(0.35)

Como se puede observar en la tabla anterior las frecuencias postrasplante son iguales a las frecuencias del grupo de donadores.

Para el análisis de asociación de estos polimorfismos al desarrollo de EICH, el grupo de pacientes postrasplante se categorizó considerando la presencia o ausencia de

enfermedad a los dos años postrasplante, así como la posible evolución aguda o crónica de la enfermedad se presentó de manera aguda o crónica (Tabla 9).

Aunque en la tabla 6 se observan tendencias de asociación (SNPs A7374G y G5326A) estas no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 9. Frecuencias alélicas y genotípicas en el grupo de pacientes postrasplante

		Sin EICH n=10		EICH agudo n=9		EICH crónico n=33		
		n	Frec	n	Frec	n	Frec	
NKG2A	C-798G							
	Alelo	C	7	(0.35)	8	(0.44)	31	(0.47)
		G	13	(0.65)	10	(0.56)	35	(0.53)
	Genotipo	C C	0	(0.00)	2	(0.22)	8	(0.24)
		C G	7	(0.70)	4	(0.44)	15	(0.45)
		G G	3	(0.30)	3	(0.33)	10	(0.30)
	C17288G							
	Alelo	G	8	(0.40)	7	(0.39)	25	(0.38)
		C	12	(0.60)	11	(0.61)	41	(0.62)
	Genotipo	C C	3	(0.30)	2	(0.22)	13	(0.39)
C G		6	(0.60)	7	(0.78)	15	(0.45)	
G G		1	(0.10)	0	(0.00)	5	(0.15)	
NKG2D	A7374G							
	Alelo	G	17	(0.85)	17	(0.94)	63	(0.95)
		A	3	(0.15)	1	(0.06)	3	(0.05)
	Genotipo	G G	7	(0.70)	8	(0.89)	30	(0.91)
		G A	3	(0.30)	1	(0.11)	3	(0.09)
		A A	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)
	G5326A							
	Alelo	G	17	(0.85)	17	(0.94)	62	(0.94)
		A	3	(0.15)	1	(0.06)	4	(0.06)
	Genotipo	G G	7	(0.70)	8	(0.89)	29	(0.88)
G A		3	(0.30)	1	(0.11)	4	(0.12)	
A A		0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)	
T-4068A								
Alelo	T	12	(0.60)	11	(0.61)	41	(0.62)	
	A	8	(0.40)	7	(0.39)	25	(0.38)	
Genotipo	T T	3	(0.30)	2	(0.22)	13	(0.39)	
	T A	6	(0.60)	7	(0.78)	15	(0.45)	
	A A	1	(0.10)	0	(0.00)	5	(0.15)	
NKG2F	T1413C							
	Alelo	C	12	(0.60)	10	(0.56)	40	(0.61)
		T	8	(0.40)	8	(0.44)	26	(0.39)
	Genotipo	C C	3	(0.30)	1	(0.11)	12	(0.36)
		C T	6	(0.60)	8	(0.89)	16	(0.48)
		T T	1	(0.10)	0	(0.00)	5	(0.15)
	C1091G							
	Alelo	C	8	(0.40)	7	(0.39)	26	(0.39)
		G	12	(0.60)	11	(0.61)	40	(0.61)
	Genotipo	C C	1	(0.10)	0	(0.00)	5	(0.15)
C G		6	(0.60)	7	(0.78)	16	(0.48)	
G G		3	(0.30)	2	(0.22)	12	(0.36)	

Haplotipos

Como se describió anteriormente estos polimorfismos conforman haplotipos asociados a la capacidad citotóxica, por lo que se analizaron las frecuencias de haplotipos en grupos postrasplante, para su posible asociación con EICH.

En la Tabla 10 se observan las frecuencias de los haplotipos en pacientes que desarrollan EICH aguda o crónica, así como en los pacientes que no desarrollan EICH. Se puede observar, en comparación con el grupo sin enfermedad, la frecuencia del haplotipo HNK2 es mayor en el grupo de pacientes con EICH. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativa (RM=2.790 IC 95% (0.6110-12.81), p=ns).

Tabla 10. Frecuencias de haplotipos postrasplante

Haplotipos	Sin EICH n=10	EICH agudo n=9	EICH crónico n=33
<i>hb1v</i>			
HNK1v	12 (0.600)	10 (0.556)	40 (0.606)
LNK1v	8 (0.400)	7 (0.389)	25 (0.379)
NK1a	0 (0.0)	1 (0.056)	1 (0.015)
NK1b	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>hb2</i>			
HNK2	17 (0.850)	17 (0.940)	62 (0.939)
LNK2	3 (0.150)	1 (0.056)	3 (0.045)
NK2a	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.015)

Para finalizar el análisis, se determinó la frecuencia de los pacientes heterocigotos u homocigotos respecto de los haplotipos descritos anteriormente.

Tabla 11. Frecuencias de los haplotipos postrasplante

	Haplotipo	Sin EICH n=10	EICH agudo n=9	EICH crónico n=33
<i>hb1v</i>				
HNK1v/HNK1v	GATC/GATC	1 (0.100)	2 (0.222)	5 (0.151)
HNK1v/LNK1v	GATC/CTCG	6 (0.600)	7 (0.777)	15 (0.455)
LNK1v/LNK1v	CTCG/CTCG	3 (0.300)	0 (0.0)	13 (0.393)
<i>hb2</i>				
HNK2/HNK2	GG/GG	7 (0.700)	8 (0.888)	30 (0.910)
HNK2/LNK2	GG/AA	3 (0.300)	1 (0.111)	3 (0.090)
LNK2/LNK2	AA/AA	0 (0.000)	0 (0.000)	0 (0.000)

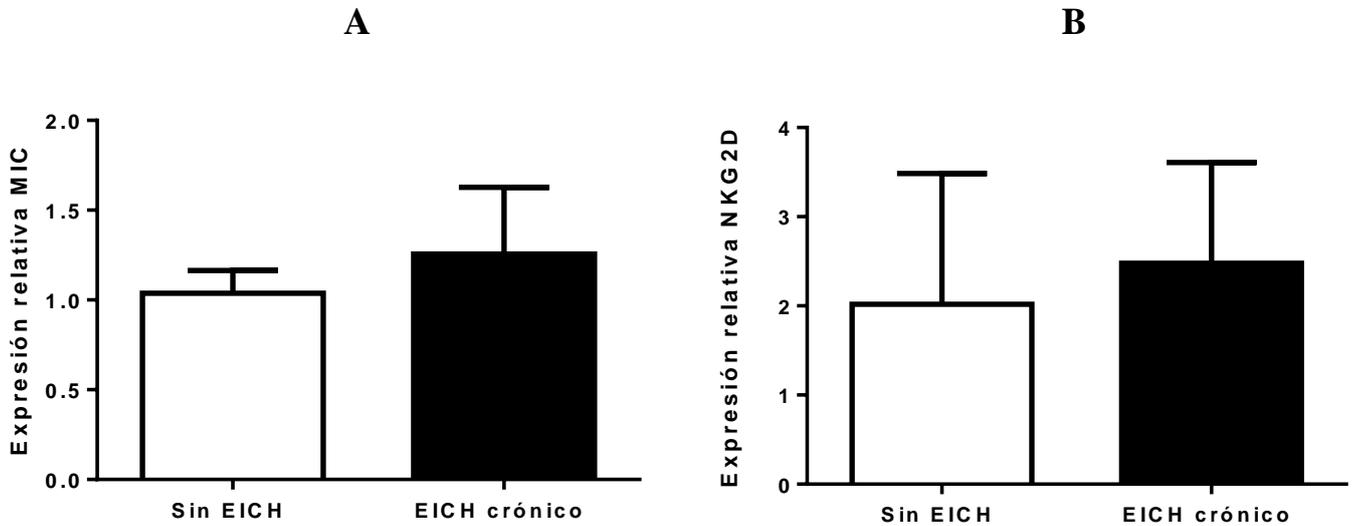
En la Tabla 11 se señalan las frecuencias de combinación de haplotipos postrasplante. Cabe destacar que la frecuencia de los pacientes homocigotos al haplotipo HNK2 (HNK2/HNK2) con EICH crónica, es mayor en contraste con el grupo libre de enfermedad a pesar de no resultar estadísticamente significativo (RM=4.286 IC 95% (0.7085-25.92), p=ns).

En estudios realizados recientemente, se ha asociado la presencia de los haplotipos de alta citotoxicidad definidos por estos polimorfismos con un aumento en la expresión del receptor NKG2D (Imai, 2012). Por tal motivo, se determinó la expresión de este receptor y sus ligandos en un grupo de pacientes que posterior al trasplante no presentaron EICH comparando con un grupo de pacientes que desarrollo la enfermedad de manera crónica. En este experimento los niveles de expresión génica se calcularon en relación al grupo de donadores, ya que de este grupo de pacientes provienen las células que reconstituyen la hematopoyesis en el receptor (Fig. 7).

Los pacientes considerados dentro del grupo sin EICH (n=4) presentan la combinación de haplotipos LNK1v/HNK1v y HNK2/LNK2, mientras que los pacientes con EICH crónico (n=5) LNK1v/LNK1v y HNK2/HNK2.

Expresión génica relativa: NKG2D y MIC

Pretrasplante



Postrasplante

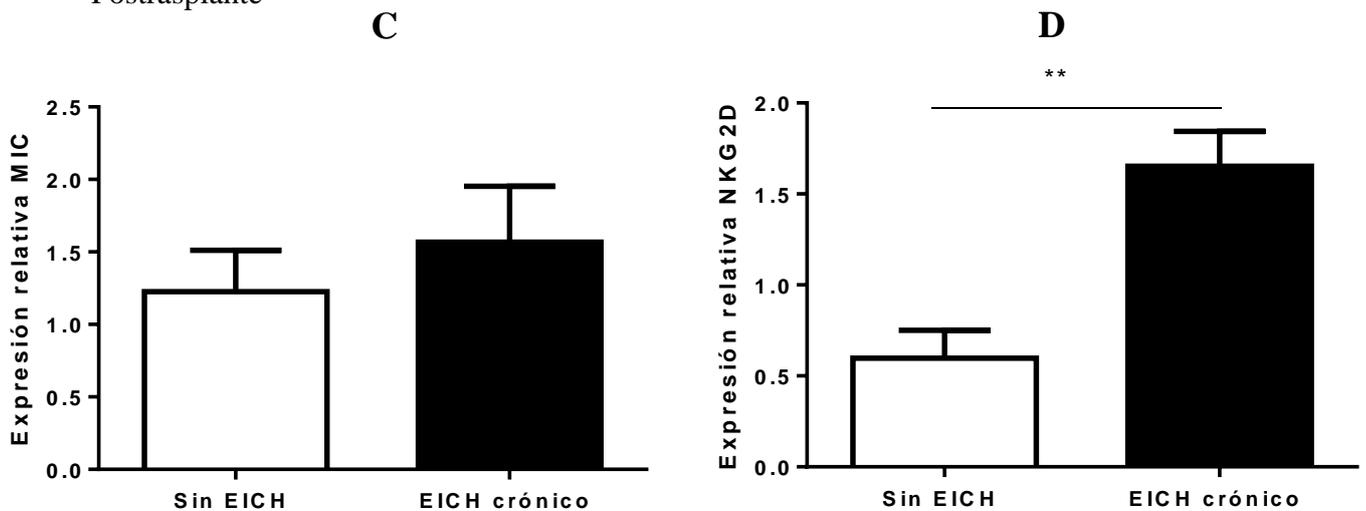


Fig 7. Expresión génica relativa de MIC y NKG2D en pacientes sin EICH (n=4) versus EICH crónico (n=5).

Los pacientes considerados dentro del grupo sin EICH presentan la combinación de haplotipos LNK1v/HNK1v y HNK2/LNK2, mientras que los pacientes con EICH crónico LNK1v/LNK1v y HNK2/HNK2. (a) y (b) expresión relativa de MIC y NKG2D pretrasplante, respectivamente. (c)(d) expresión relativa de MIC y NKG2D postrasplante. Media \pm DS, **p<0.01

Discusión de resultados

La actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ y NK se ha asociado a la presencia de los SNPs de los genes NKG2A (C-798G), NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G) y NKG2D (C17288G, A7374G y G5326A). Dado que ambos tipos celulares participan en el desarrollo de la EICH como efectores alogénicos, el objetivo de este estudio fue analizar la asociación de la presencia de estos SNPs con el desarrollo de la enfermedad.

Debido a que no se conocen las frecuencias de estos SNPs fue necesario incluir en el estudio un grupo control de individuos clínicamente sanos. En la Tabla 3 se pueden observar las frecuencias de cada uno de los SNPs analizados como alelos individuales y en su conformación de genotipos para en el grupo control. En general, las frecuencias de los SNPs C-798G (NKG2A), T-4068A, T1413C y C1091G (NKG2F), así como C17288G (NKG2D) no son muy diferentes a lo reportado en la base de datos de SNP del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). En este estudio se encontró que el polimorfismo A7374G tiene una frecuencia de 0.09, mientras que el SNP G5326A de 0.08 en población mexicana a diferencia con lo reportado en NCBI (0.236 y 0.183, respectivamente) para población japonesa, esta discrepancia evidencia la enorme variación entre grupos raciales.

En el análisis de desequilibrio de ligamiento para la formación de haplotipos, en contraste a lo reportado por Hayashi *et al*, los SNPs C17288G, T-4068A, T1413C, C1091G y C-798G no conforman un solo haplotipo como en población japonesa, ya que el polimorfismo del gen NKG2A (C-798G) presenta valores de $r^2 < 80$. Por lo tanto, esta variante del haplotipo *hb1* (*hb1v*) solo se conforma de los SNPs C17288G, T-4068A, T1413C y C1091G.

Dentro de este bloque, el haplotipo formado por los alelos CTCC (C17288G, T-4068A, T1413C y C1091G, respectivamente) se ha asociado con la alta actividad citotóxica (HNK1) en población japonesa. En nuestro estudio también se encontró otra diferencia en este haplotipo. El alelo C del SNP C1091G cambia por el alelo G, quedando el haplotipo CTCG variante de HNK1 (*HNK1v*), este polimorfismo codifica para el cambio de aspargina por una serina en la posición 104 de la proteína NKG2F. El cambio de este aminoácido podría interferir en el plegamiento de la proteína o bien en

capacidad de fosforilación, lo que podría alterar la actividad citotóxica. A pesar de no conocerse la función específica de este receptor (NKG2F) se ha encontrado que la proteína se asocia con la molécula adaptadora DAP12 (proteína con motivos ITAM) y se sobre-expresa por estímulo de IL2 e IL15 (Huang, 2010), por lo que podría pensarse que se trata de un receptor de tipo activador.

Por otra parte, en el análisis de desequilibrio de ligamiento los SNPs A7374G y G5326A forman otro bloque de haplotipos (*hb2*). Además de haplotipos GG y AA (referidos como HNK2 y LNK2, respectivamente), en nuestra población se observa la presencia del haplotipo AG (al que nombramos NK2a) con una frecuencia del 0.9%.

En primer término, se analizaron las frecuencias de estos siete SNPs en la población de pacientes pretrasplante diagnosticados con diferentes malignidades hematológicas (Tabla 2) debido a que las células NK son los principales mediadores celulares en la inmunovigilancia contra cáncer. Como se observa en la Tabla 2, al comparar el grupo pretrasplante (pacientes con leucemia) vs el grupo control, se puede observar que el alelo G del SNP A737AG (NKG2D) presenta protección al desarrollo de leucemia con un valor de razón de momios de 0.5228 ($p < 0.05$). El análisis de genotipos confirma esta protección, ya que se sigue conservando cuando el alelo se encuentra en doble dosis (GG) (RM 0.5000, $p < 0.05$). En ambos casos la significancia estadística se pierde al realizar la corrección de p por el método de Bonferroni (multiplicar el valor de p por el número de especificidades analizadas).

Por otra parte, se estudiaron las frecuencias de los haplotipos en ambas poblaciones (pretrasplante y grupo control) y sólo evidencia diferencia estadísticamente significativa para los haplotipos HNK2 y NK2a con valores de razón de momios de 0.54 y 5.55 respectivamente, por lo que el primer haplotipo, HNK2, podría ser de protección, mientras que el segundo, NK2a, de riesgo para el desarrollo de las enfermedades englobadas dentro del grupo de pacientes pretrasplante.

Al estratificar el grupo de pacientes pretrasplante por el tipo de enfermedad hematológica (Tabla 5) se analizaron las frecuencias de los siete SNPs estudiados en los pacientes con LMA y LLA. Aunque el tamaño de las poblaciones analizadas es muy pequeño (24 y 14 pacientes, respectivamente), las frecuencias de los SNPs muestran tendencias de asociación por lo que para establecer la asociación de estos polimorfismos con estas enfermedades es necesario aumentar el tamaño de la población analizada.

En la Tabla 7, se observan las frecuencias de los individuos homocigotos o heterocigotos para los haplotipos analizados del grupo pretrasplante *versus* el grupo control. Interesantemente, se observa que la frecuencia de los individuos homocigotos para el haplotipo de baja citotoxicidad (LNK2/LNK2) es mayor en el grupo pretrasplante y se asocia como factor de riesgo (RM 23.40). Sin embargo, es importante destacar que el intervalo de confianza es amplio por lo que es necesario aumentar el número de pacientes incluidos en este estudio.

Al ser los donadores genéticamente relacionados con el grupo pretrasplante se analizaron las frecuencias de los siete SNP, estudiados como alelos, genotipos y haplotipos y se comparó con el grupo control. Los resultados no mostraron ninguna diferencia entre los donadores y el grupo control.

La asociación de riesgo del haplotipo que incluye el SNP A7374G (LNK2) en el grupo pretrasplante puede tener relación con la funcionalidad de las células NK. Este polimorfismo da un cambio de aminoácido de una treonina por una alanina en la posición 72 del receptor activador NKG2D. La posición de este SNP es muy cercana al sitio de interacción de este receptor con la molécula adaptadora DAP10 (arginina 65). El cambio de un aminoácido polar por uno no polar en esta posición podría brindar al receptor un cambio conformacional a nivel citoplasmático que afecte la interacción con DAP10 y por lo tanto la traducción de la cascada de señalización para la activación celular.

En el grupo de pacientes postrasplante las frecuencias de estos siete SNPs (alelos y genotipos) es igual al grupo de donadores (Tabla 8), esto a razón de que el sistema hematopoyético del receptor se reconstituye con células del donador.

Con el objetivo de analizar la participación de los siete SNPs estudiados en el desarrollo de EICH se dividió el grupo de pacientes en: Sin EICH (n=10), con EICH agudo (n=9) y EICH crónico (n=33). Aunque se muestran diferencias importantes entre estos grupos en cuanto a las frecuencias alélicas y genotípicas (Tabla 9) ninguna es estadísticamente significativa debido al bajo número de pacientes incluidos en los grupos. Por lo que es necesario incluir más pacientes en el estudio.

Como se puede observar el análisis de haplotipos tampoco muestra asociación significativa aunque la variación en las frecuencias entre los grupos sin EICH y con EICH (agudo y crónico) es muy notable para el haplotipo HNK2 (Tabla 10).

El haplotipo HNK1 se asocia con mayor supervivencia sin recaída posterior al trasplante de médula ósea (Espinoza, 2009). Además, este haplotipo se asocia con aumento en la expresión del receptor activador NKG2D (Imai, 2012), por lo tanto nos pareció de interés el estudio de los niveles de expresión de este receptor en los pacientes postrasplante, para asociarlo con la presencia de EICH.

En la Figura 7 se muestra la expresión de MIC en los pacientes pretrasplante y postrasplante. Los grupos fueron comparados en aquellos que desarrollaron EICH crónico y los que no presentaron EICH. Como se puede observar la expresión de MIC es menor en etapa pretrasplante que posterior al trasplante (sin significancia estadística); esto evidencia el grado de estrés celular que podría estar asociado a un estado proinflamatorio que se presenta en la EICH.

En la misma Figura 7, se observa la expresión de NKG2D (b y d). Aunque pretrasplante los niveles de expresión entre ambos grupos de pacientes es muy similar, posterior al trasplante la expresión receptor NKG2D es mayor en el grupo de pacientes que presenta EICH ($p < 0.01$).

Los pacientes considerados dentro del grupo sin EICH presentan la combinación de haplotipos LNK1 ν /HNK1 ν y HNK2/LNK2, mientras que los pacientes con EICH crónico LNK1 ν /LNK1 ν y HNK2/HNK2. Respecto a la primera combinación de haplotipos, LNK1 ν /HNK1 ν y LNK1 ν /LNK1 ν (pacientes sin y con EICH crónico, respectivamente), en contraste a lo esperado, el grupo de pacientes con EICH crónico que es homocigoto a las variantes del haplotipo de baja citotoxicidad (LNK1 ν) expresa más NKG2D. El aumento en la expresión relativa del gen NKG2D podría explicar porque la recaída en este grupo de pacientes es menor a lo reportado en pacientes sin EICH.

Con respecto a la segunda combinación de haplotipos, los pacientes sin EICH son heterocigotos a los haplotipos HNK2 y LNK2, este último haplotipo está formado por el SNP A7374G que confiere un cambio de aminoácido Thr→Ala en la región citoplasmática del receptor activador NKG2D por lo que podría estar asociado a una alteración en funcionalidad de células NK y linfocitos CD8+.

Conclusiones

- Nuestros resultados sugieren que en pacientes con leucemia la detección del polimorfismo A7374G (NKG2D) y el haplotipo HNK2, puede constituir la presencia de biomarcadores de protección significativa asociada con el desarrollo de leucemia.
- Nuestros datos sugieren que es necesario aumentar el tamaño de muestra para confirmar la asociación con el haplotipo HNK2, el cual podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de EICH.
- Por último, cabe la posibilidad que el haplotipo LNK2 en pacientes libres de EICH, provoque alteraciones en la capacidad citotóxica de estas células aloreactivas, debido a la presencia del SNP A7374G.

Perspectivas

La presencia del SNP A7374G (cambio de Tre→Ala) en la región citoplasmática del gen NKG2D, podría ocasionar alteraciones en la capacidad citotóxica de las células aloreactivas en el grupo de pacientes libres de EICH. Para confirmar esta hipótesis, se podría evaluar la capacidad mediante ensayos de citotoxicidad de las células NK y CD8+ (con este SNP) frente a una célula blanco. Además, podría ser interesante evaluar la activación de ambos tipos celulares posterior a la interacción NKG2D-ligando a través de moléculas involucradas en la vía de señalización como Akt, JNK y ERK.

Referencias

1. Allez M, Tieng V, Nakazawa A, Treton X, Pacault V, Dulphy N, Caillat-Zucman S, Paul P, Gornet JM, Douay C, Ravet S, Tamouza R, Charron D, Lemann M, Mayer L, Toubert A. CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology*, 2007; 132, 2346-58.
2. Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl E. Blood and Marrow Transplantation. *European School of Haematology*, 2000; 1-248.
3. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*, 1966. 62:21-78.
4. Borrego F, Kabat J, Kim DK et al. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol*, 2002; 38:637-60.
5. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Current Opinion in Hematology*, 2012; 18 (1): 25-33.
6. Bron D. Graft-versus-host disease. *Current Opinion in Oncology*, 1994; 6(4): 358-64.
7. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res*, 2008; 40:18-34.
8. Champsaur M, Lanier L. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* 2010; 235(1): 267-85.
9. Chen SH, Wang TF, Yang KL. Hematopoietic stem cell donation. *International Journal of Hematology*, 2013; 97(4): 446-55.
10. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 2001; 22(11): 633-40.
11. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2002; 99(10):3661-7.
12. Dhanji S, Teh HS. IL-2 activated CD8+CD44^{high} cells express both adaptive and innate immune system receptors and demonstrate specificity for syngeneic tumor cells. *J. Immunology*, 2003; 171; 3442-50.

13. Dulphy N, Haas P, Busson M, Belhadj S, Peffault de Latour R, Robin M, Carmagnat M, Loiseau P, Tamouza R, Scieux C, Rabian C, Di Santo JP, Charron D, Janin A, Socié G, Toubert A. An unusual CD56 (bright) CD16 (low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *Journal Immunology*, 2008; 181(3): 2227-37.
14. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nature Reviews Immunology*, 2007; 7(9):737-44.
15. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Kanda Y, Ohtake S, Fukuda T, Morishima Y, Kodera Y, Nakao S. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica*, 2009; 94(10):1427-34.
16. Fernández Messina L, Reyburn HT, Valés Gómez M. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Frontiers in Immunology*, 2012: 299- 25; 3:299.
17. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*, 2009; 373(9674):1550-61.
18. Furue H, Matsuo K, Kumimoto H, Hiraki A, Suzuki T, Yatabe Y, Komori K, Kanemitsu Y, Hirai T, Kato T, Ueda M, Ishizaki K, Tajima K. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. *Carcinogenesis*, 2008; 29(2):316-20.
19. Gasser, S *et al.* The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, 2005; 436, 1186-90.
20. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996; 29; 93(22):12445-50.
21. Groh,V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2003; 100, 9452-7.

22. Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Review of Hematology*, 2010; 3(3): 285-99.
23. Hauch M, Gazzola MV, Small T, Bordignon C, Barnett L, Cunningham I, Castro-Malaspina H, O'Reilly RJ, Keever CA. Anti-leukemia potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1990; 75(11): 2250-62.
24. Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Research*, 2006; 66(1):563-70.
25. Imai K, Hayashi T, Yamaoka M, Kajimura J, Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K. Effects of NKG2D haplotypes on the cell-surface expression of NKG2D protein on natural killer and CD8 T cells of peripheral blood among atomic-bomb survivors. *Human Immunology*, 2012; 73(6):686-91.
26. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, 2000; 356(1):1795-9.
27. Jaksch M, Uzunel M, Martinez Cangana G, Remberger M, Mattsson J. Increased levels of immune transcript in patients with acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2003; 31(3):183-90.
28. Joyce MG, Sun PD. The structural basis of ligand recognition by natural killer cell receptors. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 55(1): 30-44.
29. Kaiser BK, Pizarro JC, Kerns J, Strong RK. Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008; 105(18): 6696-701.
30. Kircher B, Schumacher P, Nachbaur D. Granzymes A and B serum levels in allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*, 2009; 43(10):787-91.
31. Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in Immunology*, 2012; 3:335.

32. Li HW, Sykes M. Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nature Reviews Immunology*, 2012;12 (6):403-16.
33. Lo Monaco E, Tremante E, Cerboni C, Melucci E, Sibilio L, Zingoni A, Nicotra MR, Natali PG, Giacomini P. Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells. *Neoplasia* 2011; 13(9): 822-30.
34. López-Larrea C, Suárez-Alvarez B, López-Soto A, López-Vázquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends in Molecular Medicine*, 2008; 14(4): 179-89.
35. Maeda Y. Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. *International Journal of Hematology*, 2013; 98(3):293-9.
36. Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transplant Immunology*, 2002; 10(3):147-64.
37. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1988; 16(3): 1215.
38. Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, Choi SW, Clouthier SG, Kuick R, Misek DE, Cooke KR, Kitko CL, Weyand A, Bickley D, Jones D, Whitfield J, Reddy P, Levine JE, Hanash SM, Ferrara JL. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood*, 2009; 113(2): 273-8.
39. Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S. Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Cancer*, 2013; 4(1):25-35.
40. Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nature Reviews Immunology*, 2003; 3(2):108-22.
41. Parkman R, Weinberg K. Immune reconstitution following hematopoietic cell transplantation. *Stem Cell Transplantation*, 2004; 12(6):222-32.
42. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews Immunology*, 2003; 3(10):781-90.
43. Redelinghuys P, Brown GD. Inhibitory C-type lectin receptors in myeloid cells. *Immunology Letters* 2011; 136(1): 1–12.

44. Saez-Borderias A, Guma M, Angulo A, Bellosillo B, Pende D, Lopez-Botet M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. *Eur.J.Immunol*, 2006; 36; 3198-3206.
45. Skov, S. et al. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I related chain A and B. *Cancer Research*, 2005; 65, 11136–45.
46. Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology*, 2009; 128 (1):1-6.
47. Tanaka J, Sugita J, Asanuma S, Arita K, Shono Y, Kikutchi M, Shiratori S, Wakasa K, Yasumoto A, Shigematu A, Kondo T, Kobayashi T, Asaka M, Imamura M. Increased number of CD16(+)CD56(dim) NK cells in peripheral blood mononuclear cells after allogeneic cord blood transplantation. *Human Immunology*, 2009; 70(9): 701-
48. Tsirigotis PD, Resnick IB, Shapira MY. The role of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of Medicine*, 2012; 44: 130–145.
49. Ullrich E, Koch J, Cerwenka A, Steinle A. New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology. *Oncoimmunology*, 2013; 2(10): e26097-1-9.
50. Unni AM, Bondar T, Medzhitov R. Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A*. 2008;105(5):1686-91.
51. Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood*, 2004; 103: 3065–72.
52. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and nonmalignant disease. *Lancet*, 1995. 346:214–19
53. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annual Review of Immunology*, 2007; 25:139-70.