



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ANÁLISIS DE LOS DIFERENTES HAPLOTIPOS DE LOS RECEPTORES
NKG2 Y SU PARTICIPACIÓN EN LA FUNCIÓN CITOTÓXICA DE LAS
CÉLULAS NK Y CD8.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M en C. WENDY GUADALUPE VÁZQUEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
UIM EN INMUNOLOGÍA, UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMN SIGLO XXI, IMSS.

COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2023.



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.

Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias Biomédicas

PDCB/FM/059/2023.

Lic. Diana González Nieto

Directora de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM

P r e s e n t e.

Nos permitimos informar que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS** en su reunión 538 del 16 de agosto del 2023, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **WENDY GUADALUPE VAZQUEZ GONZALEZ** con número de cuenta **303292120** con la tesis titulada **“Análisis de los diferentes haplotipos de los receptores NKG2 y su participación en la función citotóxica de las células NK y CD8.”**, dirigida por la Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez.

Presidente: Dr. Federico Avila Moreno.
Secretario: Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez.
Vocal: Dr. José Carlos Crispin Acuña.
Vocal: Dr. Juan José Montesinos Montesinos.
Vocal: Dra. Paula Licon Limón.

Asimismo, informo a los honorables miembros del jurado que, de acuerdo con los lineamientos generales para el funcionamiento del posgrado, tendrán un máximo de 30 días hábiles, contados a partir del momento en que reciban el manuscrito de la tesis para revisar y emitir por escrito su voto probatorio fundamentado.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"Por mi raza hablará el espíritu"
Ciudad Universitaria, Cd. de Mx., a 16 de agosto del 2023.
Representante de la Dirección de Facultad Medicina



Dr. Abraham Landa Piedra
Profesor Titular C de T. C.
Representante del Programa Posgrado en Ciencias Biomédicas
Sede Facultad de Medicina

Agradecimientos

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por permitirme formar parte de su alumnado y desarrollarme profesionalmente.

Apoyos económicos recibidos para la realización de este proyecto:

Beca de Doctorado CONACYT (CVU: 440851)

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

Dra. Martha Legorreta Herrera

Dedicatoria

En primer término no puedo dejar de agradecer a la persona más maravillosa que he conocido y que Dios me dio el privilegio de tener a mi lado para aprender de él por los primeros 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 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 Lucero, Irma y Ricardo por estar siempre incondicionalmente junto a mi y cuidarme.

A el amor de mi vida por todos tus consejos, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por no soltar mi mano, por creer en mi e impulsarme a ser un mejor ser humano y profesionalista, mil gracias.

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.

Índice

Resumen.....	vi
Abstract.....	viii
1. Introducción.....	1
1.1. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.....	1
1.2. Tipos de trasplante.....	5
1.3. Enfermedad injerto contra hospedero (EICH).....	7
1.3.1. EICH aguda.....	8
1.3.2. EICH crónica.....	14
1.5. Linfocitos T CD8+.....	21
1.6.1. NKG2A.....	25
1.6.3. NKG2D.....	26
1.7. NKG2D y TCPH.....	31
2. Justificación.....	34
3. Hipótesis.....	35
4. Objetivo.....	36
5. Material y métodos.....	38
5.1. Diseño del estudio.....	38
5.2. Población de estudio.....	38
5.3. Recolección de muestras de sangre.....	41
5.4. Extracción del DNA.....	41
5.5. Genotipificación.....	42
5.6. Secuenciación.....	42
5.7. Extracción de RNA.....	43
5.8. Síntesis de cDNA.....	43
5.9. Expresión génica relativa del receptor NKG2D.....	44
5.10. Aislamiento de células NK.....	45
5.11. Determinación de la capacidad citotóxica de células NK.....	45
5.12. Citometría de flujo.....	46
5.13. Análisis estadístico.....	46

6.	Resultados	48
6.1.	Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 en población mexicana.	48
6.2.	Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 en pacientes con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y respectivos sus donadores relacionados	56
6.3.	Análisis de los haplotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 y su asociación con la función citotóxica de células NK derivadas de donantes clínicamente sanos.	64
6.4.	Análisis de la expresión génica relativa del receptor NKG2D en pacientes con EICH.....	66
6.5.	Análisis de la función citotóxica en células NK de pacientes posterior al TCPH.....	67
6.6.	Asociación de los haplotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 con la expresión del receptor NKG2D en linfocitos T CD8+, así como en células NK CD56 ^{bright} y CD56 ^{dim} en pacientes con EICH posterior al TCPH.....	68
6.7.	Análisis de los haplotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 y su asociación con la función citotóxica de las células NK en pacientes postrasplante.....	70
7.	Discusion de resultados	72
8.	Conclusiones	80
9.	Perspectivas	81
10.	Referencias	82

Índice de figuras

Figura 1. Fisiopatología de la enfermedad injeto contra hospedero (EICH) aguda.	13
Figura 2. Fisiopatología de la EICH crónica.	17
Figura 3. Mecanismos de reconocimiento inmunológico por células NK.	19
Figura 4. Vías de señalización de los receptores de la familia NKG2 en células NK.	30
Figura 5. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la región génica que codifica para la expresión de la familia de receptores NKG2.....	33
Figura 6. Identificación de la variante del haplotipo del bloque 1 (hb-1v).	55
Figura 7. Estrategia de análisis para las pruebas de citotoxicidad.....	64
Figura 8. Los haplotipos hb-1v se asocian a la función citotóxica de células NK en donantes clínicamente sanos.....	65
Figura 9. Sobreexpresión del gen que codifica para el receptor NKG2D en pacientes con enfermedad injerto contra hospedero (EICH).	66
Figura 10. Función citotóxica de células NK posterior al TCPH.....	68
Figura 11. Expresión del gene que codifica para el receptor NKG2D en presencia de los haplotipos hb-1v en células T CD8+, así como células NK CD56bright y CD56dim posterior al TCPH.....	70
Figura 12. Asociación de la función citotóxica entre los haplotipos hb-1v posterior al TCPH.....	71

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Iniciadores para los ensayos de secuenciación.....</i>	51
Tabla 2. <i>Frecuencias de alelos y genotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 en población Mexicana.....</i>	52
Tabla 3. <i>Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 entre población mexicana, población de Los Angeles California con ancestría mexicana, africana, europea y asiática</i>	53
Tabla 4. <i>Frecuencia del la variante del haplotipo del bloque 1 (hb-1v)</i>	55
Tabla 5. <i>Características clínicas de la población de pacientes incluidos en el presente estudio.....</i>	58
Tabla 6. <i>Asociación estadística de los alelos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 con el desarrollo de la EICH.....</i>	60
Tabla 7. <i>Asociación estadística de genotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 con el desarrollo de la EICH.....</i>	61
Tabla 8. <i>Asociación estadística de haplotipos con el desarrollo de la EICH</i>	63

Abreviaturas

ADCC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos
Akt	Proteína cinasa B
APCs	Células presentadoras de antígeno
ATP	Adenosín trifosfato
CCL1	Ligando 1 quimiocina con motivo C-C
CCL2	Ligando 2 quimiocina con motivo C-C
CCL3	Ligando 3 quimiocina con motivo C-C
CCL4	Ligando 4 quimiocina con motivo C-C
CCL5	Ligando 5 quimiocina con motivo C-C
CCL17	Ligando 17 quimiocina con motivo C-C
CCL27	Ligando 27 quimiocina con motivo C-C
cDNA	DNA complementario
cPLA2	Proteína fosfolipasa A2 citosólica
CXCL2	Ligando 2 quimiocina con motivo CXC
CXCL8	Ligando 8 quimiocina con motivo CXC
CXCL9	Ligando 9 quimiocina con motivo CXC
CXCL10	Ligando 10 quimiocina con motivo CXC
CXCL11	Ligando 11 quimiocina con motivo CXC
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DAP10	Proteína adaptadora de activación 10
DAP12	Proteína adaptadora de activación 12
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EICH	Enfermedad injeto contra hospedero
EICHa	Enfermedad injeto contra hospedero aguda
EICHc	Enfermedad injeto contra hospedero crónica
EICL	Efecto injerto contra leucemia
Erk	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
Fas	Receptor de muerte celular
FasL	Ligando del receptor FAS
G-CSF	Factor estimulante de crecimiento de granulocitos
GI	Tracto gastrointestinal
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
Grb2	Proteína de unión 2 al receptor del factor de crecimiento
Gzm	Granzima
hb-1	Bloque de haplotipos 1
hb-1v	Variante del bloque de haplotipos 1
hb-2	Bloque de haplotipos 2
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HLA-E	Antígeno leucocitario humano E
HMGB-1	Proteína de la caja 1 del grupo del grupo de alta movilidad
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1	Interleucina 1

IL-2	Interleucina 2
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-33	Interleucina 33
ILD	Infusión de linfocitos de donador
IQR	Índices intercuartílicos
ITAM	Inmunoreceptor con motivos de activación basados en tirosina
ITIM	Inmunoreceptor con motivos de inhibición basados en tirosina
JAK2	Proteína cinasa Janus
JNK	Proteína cinasa N-terminal C-Jun
KIR	Receptores tipo inmunoglobulinas de células NK
KLRK1	Receptor K1 tipo lectina de células NK
KLRK4	Receptor K4 tipo lectina de células NK
LAT	Linker de activación de células T
LD	Desequilibrio de ligamiento
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
MEK1/2	Proteína cinasa Erk 1 y 2
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MICA	Proteína A parecida a MHC clase I
MICB	Proteína B parecida a MHC clase I
NK	Células asesinas naturales
NKG2	Grupo 2 de receptores de células NK
NKG2A	Miembro A del grupo 2 de receptores de células NK
NKG2B	Miembro B del grupo 2 de receptores de células NK
NKG2C	Miembro C del grupo 2 de receptores de células NK
NKG2D	Miembro D del grupo 2 de receptores de células NK
NKG2F	Miembro F del grupo 2 de receptores de células NK
NLRs	Receptores tipo NOD
OR	Razón de momios
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en la cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Cinasa 3 de fosfoinositol
PLC- γ 2	Fosfoinositido fosfolipasa C gamma 2
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR	PCR en tiempo real
SHP-1	Tirosin fosfatasa 1 con homología a Scr
SHP-2	Tirosin fosfatasa 2 con homología a Scr
SLP-76	Proteína leucocitaria de 76kDa que incluye un dominio SH2
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SPM	Sangre periférica movilizada
STAT5	Factor de transcripción 5 para la traducción de señales y activación
Syk	Proteína tirosina cinasa
TCPH	Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas
TECs	Células endoteliales tímicas
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T helper 1
Th17	Linfocitos T helper 17
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	Ligando inducido de apoptosis similar a TNF
ULBPs	Proteínas de unión a UL-16
Vav1	Factor 1 de intercambio de nucleotidos de guanina vav
ZAP70	Proteína cinasa de 70 asociada a la cadena zeta

Resumen

La enfermedad injerto contra hospedero (EICH) representa la principal complicación posterior al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), presentándose en más del 60% de los pacientes. Dicha enfermedad es originada por la reacción (activación) de las células aloreactivas (células NK y linfocitos T CD8+) del donante en contra del tejido del hospedero (receptor). De manera previa, la actividad citotóxica de las células alorreactivas ha asociado a la presencia de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en genes que codifican para la familia de receptores NKG2 los cuales conforman haplotipos. El objetivo del presente trabajo consistió en identificar la asociación de los haplotipos genéticos de la familia de receptores NKG2 con el desarrollo de EICH posterior al TCPH alogénico, así como, con la función citotóxica de las células NK y CD8+. Inicialmente, se analizó la frecuencia de los SNPs: rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171, rs1983526, rs2255336, y rs2246809 en un grupo sin EICH de 927 individuos mexicanos clínicamente sanos mediante ensayos de discriminación alélica. Por otra parte, se evaluó la frecuencia de los alelos, genotipos y haplotipos mencionados previamente en una cohorte de 131 pacientes con diagnóstico de TCPH alogénico de donador relacionado (HLA compatibles) y se determinó la asociación de estos SNPs con el desarrollo de EICH, así como con la expresión del mRNA y proteína del receptor NKG2D con la actividad citotóxica de las células NK. Los resultados obtenidos determinaron que los alelos y genotipos más frecuentes fueron C, CG para rs1049174; G, GG para rs2255336; T, AT para rs2617160; G, GG para rs2246809; C, CT para rs2617170; G, CG para rs2617171; y G, CG para rs1983526. Nuestro análisis de desequilibrio de ligamiento mostró que los SNPs: rs1049174, rs2617160, rs2617170, y rs2617171 conforman la variante del bloque de haplotipos-1 (hb-1v) ($r^2 \geq 0.89$), donde los haplotipos predominantes fueron CTCG and GATC. En pacientes sometidos a TCPH, la condición de homocigoto para el haplotipo GATC se asoció con el riesgo a desarrollo de EICH, OR 7.85 (1.01-61.05), $p=0.025$, mientras que la condición de homocigoto para el haplotipo CTCG presenta una tendencia de protección para el desarrollo de la enfermedad OR 0.48 (0.21-1.08), $p>0.05$. Adicionalmente, el haplotipo CTCG se asocia con la disminución en la expresión del receptor NKG2D en células NK CD56^{bright}

($p < 0.05$), así como, con un reducción en la actividad citotóxica frente a células blanco ($p > 0.0041$). En conclusión, determinamos que el bloque de haplotipos hb-1v poseen una participación esencial en el desarrollo de la EICH posterior al TCPH alogénico derivado de donador relacionado. Además, demostramos que el haplotipo GATC constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, mientras que el haplotipo CTCG se encuentra asociado con la disminución en la expresión del receptor NKG2D, así como en una reducción en la capacidad citotóxica de células NK, mediante ensayos *in vitro*.

Abstract

Graft-versus-host disease (GVHD) is the main complication after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), which occurs in more than 60% of patients in patients undergoing HSCT. This disease is caused by the reaction (activation) of the alloreactive cells (NK cells and CD8+ T lymphocytes) of the donor against the tissue of the host (recipient). Previously, the cytotoxic activity of alloreactive cells has been associated with the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes that encode the NKG2 receptor family, which make up haplotypes. The objective of the present work was to identify the association of the genetic haplotypes of the NKG2 receptor family with the development of GVHD after allogeneic HSCT, as well as with the cytotoxic function of NK and CD8+ cells. Initially, the frequency of the SNPs: rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171, rs1983526, rs2255336, and rs2246809 was evaluated in a group without GVHD of 927 clinically healthy Mexican individuals using allelic discrimination assays. On the other hand, the frequency of the previously mentioned alleles, genotypes and haplotypes was evaluated in a cohort of 131 patients with a diagnosis of allogeneic HSCT from a related donor (HLA compatible) and the association of these SNPs with the development of GVHD was determined, as well as as with the expression of NKG2D receptor mRNA and protein with the cytotoxic activity of NK cells. The results obtained determined that the most frequent alleles and genotypes were C, CG for rs1049174; G, GG for rs2255336; T, AT for rs2617160; G, GG for rs2246809; C, CT for rs2617170; G, CG for rs2617171; and G, CG for rs1983526. Our linkage disequilibrium analysis showed that the SNPs: rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171 make up the haplotype block variant-1 (hb-1v) ($r^2 \geq 0.89$), where the predominant haplotypes were CTCG and GATC. In patients undergoing HSCT, the homozygous condition for the GATC haplotype was associated with the risk of developing GVHD, OR 7.85 (1.01-61.05), $p=0.025$, while the homozygous condition for the CTCG haplotype presented a trend of protection for the development of the disease OR 0.48 (0.21-1.08), $p>0.05$. Additionally, the CTCG haplotype is associated with a decrease in the expression of the NKG2D receptor in CD56bright NK cells ($p<0.05$), as well as with a reduction in cytotoxic activity against target cells ($p>0.0041$). In conclusion, we determined that the hb-1v

haplotype block plays an essential role in the development of GVHD following allogeneic HSCT derived from a related donor. Furthermore, we demonstrate that the GATC haplotype constitutes a risk factor for the development of the disease, while the CTCG haplotype is associated with a decrease in the expression of the NKG2D receptor, as well as a reduction in the cytotoxic capacity of NK cells. through in vitro tests.

1. Introducción

1.1. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

El trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es la inmunoterapia celular más efectiva contra enfermedades hematológicas malignas y no malignas (1). El TCPH es considerado como una terapia de consolidación que involucra la administración de un régimen de acondicionamiento y el injerto de células troncales y progenitoras hematopoyéticas provenientes de un donador (2,3).

El régimen de acondicionamiento y/o preparativo son esquemas de quimioterapia que se administran al paciente antes del trasplante con el objetivo de proveer suficiente inmunosupresión para permitir el injerto y reducir al máximo la carga tumoral (4,5). La administración del régimen de acondicionamiento es esencial para el éxito del TCPH, aunque estos esquemas de quimioterapia pueden provocar excesiva toxicidad en el paciente. En este contexto, los esquemas de acondicionamiento pueden clasificarse en mieloablativos (quimioterapia en altas dosis), intensidad reducida y no mieloablativos. El régimen mieloablativo consiste en la administración de alquilantes (uno o múltiples) con o sin radiación corporal total. Este régimen de acondicionamiento abate la celularidad dentro de médula ósea sin permitir una recuperación de la hematopoyesis autóloga, su administración es de alta toxicidad para el paciente. En contraste, el régimen no mieloablativo es potencialmente inmunosupresor de manera que puede causar citopenias pero no requiere soporte con injerto de células troncales y progenitoras provenientes de un donador, por lo que, ofrece menor potencia antitumoral y menor toxicidad para el paciente. Por último, el régimen de intensidad reducida, ocasiona citopenias prolongadas que requieren soporte con células troncales y progenitoras, pero la dosis de agentes alquilantes o radiación corporal total que se administran es reducida hasta un 30% comparado con el régimen mieloablativo. Con base en lo anterior, los esquemas no mieloablativo y/o de intensidad reducida ocasionan menor toxicidad para

los pacientes por lo que estos se administran en pacientes de edad avanzada y/o con comorbilidades ya que estos pacientes son más vulnerables a la toxicidad del trasplante (4,6,7). Además, para la elección del régimen de acondicionamiento también debe considerarse la enfermedad de diagnóstico y estatus de remisión al momento del trasplante. Enfermedades como la leucemia mieloide crónica, linfoma folicular y leucemia linfocítica crónica son altamente sensibles a la eliminación por células del donador por lo que requieren un régimen de intensidad reducido, mientras que las leucemias agudas de alto riesgo con alteraciones citogenéticas, o incluso leucemias en remisión con enfermedad mínima residual detectable son menos sensibles a la quimioterapia y son candidatas a un régimen de acondicionamiento mieloablativo (4,6).

Aunque la quimioterapia administrada como parte del régimen de acondicionamiento disminuye al máximo la carga tumoral, algunas de las células leucémicas tienen la capacidad de escapar de la quimioterapia y dar lugar a recaída posterior (5). Por lo tanto, el TCPH ofrece una opción curativa a pacientes a través de la citoreducción de las células características de la enfermedad (provista por el régimen de acondicionamiento) y a la eliminación de la enfermedad residual a través del efecto antineoplásico de la respuesta inmune alogénica (células provenientes del donador) conocido como “Efecto Injerto contra Leucemia” (EICL) (1,4,7). El EICL es una respuesta inmunológica realizada por células T, NK y otros efectores del sistema inmune del donador, los cuales reconocen antígenos alogénicos o específicos en células residuales de leucemia que permiten la eliminación de éstas (1). Sin embargo, las células aloreactivas también desencadenan una respuesta inmune patogénica contra tejido no hematopoyético del receptor que se conoce como enfermedad injerto contra hospedero (EICH), se considera dentro de las principales complicaciones postrasplante (3). La EICH se origina a causa del reconocimiento de las diferencias antigénicas entre donador y receptor, que es considerada una enfermedad sistémica que afecta la piel, el tracto gastrointestinal, el hígado y los pulmones, aunque también puede afectar cualquier otro órgano (8).

El TCPH alogénico se realiza entre individuos que no son idénticos genéticamente. Sin embargo, debe existir compatibilidad entre donador y receptor para llevar a cabo este procedimiento; la compatibilidad es mediada principalmente por los antígenos

leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés *human leukocyte antigens*). Los genes que codifican para el sistema HLA se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6, la región más polimórfica del genoma humano. Existen dos clases de moléculas HLA, clase I y clase II. En el caso del HLA de clase I, éstas se expresan en todas las células y presentan péptidos a los linfocitos T CD8⁺; en cambio HLA de clase II se expresan principalmente en las células presentadoras de antígeno (APCs, por sus siglas en inglés *antigen presenting cells*) y presentan péptidos a linfocitos T CD4⁺ (9).

Considerando el polimorfismo de las moléculas del HLA, existe mayor probabilidad de compatibilidad entre hermanos por lo que son considerados los donadores ideales para TCPH y la elección es de acuerdo al grado de compatibilidad. En caso de no contar con donador HLA compatible relacionado (hermano), se recurre a donadores compatibles en HLA no relacionados (no familiares). Los donadores no relacionados provienen de la búsqueda en registros de bancos de donadores a nivel mundial pero la disponibilidad de este tipo de donadores es limitada debido a la alta tasa de polimorfismo en las moléculas de HLA, especialmente para pacientes con genotipos HLA poco frecuentes. En caso de no existir ningún donador compatible al 100% (relacionado o no relacionado), se selecciona un donador que presente menor grado de incompatibilidad en HLA o comparta un haplotipo, es decir de un donador haplohídrico. Una vez elegido el mejor candidato para la donación, el donador debe someterse a una serie de revisiones médicas y estudios de laboratorio con el objetivo de evaluar su estado de salud y la seguridad del TCPH (10,11).

El TCPH requiere la infusión de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (injerto) que se pueden obtener de médula ósea, sangre periférica movilizada y/o sangre de cordón umbilical. En cuanto a la médula ósea, ésta fue la primer fuente del injerto celular empleada para el TCPH. El procedimiento de obtención del injerto de médula ósea requiere la entrada a quirófano del donador bajo anestesia general para llevar a cabo múltiples aspirados de médula ósea. Debido al riesgo que implica este procedimiento para el donador fue evidente la necesidad de explorar otras fuentes menos invasivas. Actualmente, la sangre periférica movilizada (SPM) es la fuente más común de células para el TCPH y es un proceso de obtención que requiere la administración de

factor estimulante de colonias de granulocitos para movilizar células troncales y progenitoras a sangre periférica y posteriormente cosecharlas mediante aféresis (12). Actualmente, la SPM es la fuente celular más empleada debido a la alta proporción de células progenitoras y precursoras obtenidas, periodos cortos de injerto y recuperación hematológica, lo cual disminuye los tiempos de hospitalización del paciente, así como el riesgo de recaída. A pesar de las ventajas del uso de SPM, esta fuente celular también ha sido asociada con mayor riesgo de desarrollo de EICH, tanto aguda como crónica (13,14). En cuanto a la sangre de cordón umbilical, su uso fue inicialmente restringido al trasplante en niños debido al número limitado de células troncales y progenitoras disponibles por cordón umbilical (una unidad de cordón umbilical contiene 1/10 de la cantidad de células requeridas a partir de médula ósea y 1/20-1/30 de las células que pueden ser obtenidas a partir de SPM). En la actualidad, se emplean dos unidades de cordón umbilical no relacionadas y compatibles entre sí como fuente celular para TCPH en adultos, lo cual ha demostrado brindar suficiente número de células troncales y progenitoras para lograr el injerto. Debido a la inmadurez de las células progenitoras y troncales disponibles en sangre de cordón umbilical, esta fuente se ha asociado con tiempos de injerto y hospitalización prolongados, así como con menor incidencia en el desarrollo de EICH (10).

Posterior al TCPH, la recaída es la causa más común de muerte en pacientes con diagnóstico de leucemia de alto riesgo. La incidencia de muerte posterior al TCPH alogénico es de 45.8%; donde el 38.7% de los pacientes muere a causa de recaída, 23.8% por infecciones y 19% por causas asociadas a la EICH. Sin embargo, la frecuencia de la causa de muerte es variable por depender del periodo postrasplante. En este contexto, las infecciones son la causa más común de muerte dentro de los primeros 30 días, al día 100 son la EICH, infecciones y recaída, mientras que a periodos más prolongados (1-5 años) la principal causa de muerte es la recaída (15,16). En los pacientes con recaída postrasplante se ha empleado diferentes estrategias terapéuticas de rescate, como la infusión de linfocitos del donador (ILD). La ILD se administran células T maduras provenientes del mismo donador en pacientes con alto riesgo de recaída o en aquellos que entran a remisión posterior a la recaída postrasplante. El objetivo de la ILD es reestablecer el EICL y sus propiedades terapéuticas; así el 67% de los pacientes

con recaída logra remisión molecular con un 95% de sobrevida a 3 años. A pesar de los beneficios de la inducción del EICL también la ILD está asociada a mayor incidencia en el desarrollo de EICH (1).

Con base en lo anterior, el TCPH es la inmunoterapia más efectiva debido a su potencial curativo en pacientes con leucemia; la cual está relacionada con la capacidad de los linfocitos T, NK, así como otras células del sistema inmune del donador para mediar el EICL y evitar la recaída. Sin embargo, el donador también puede dirigir su respuesta inmune contra tejido sano del receptor, dando origen al desarrollo EICH. En virtud que tanto EICH como EICL se presentan simultáneamente en pacientes con TCPH, es necesario controlar el desarrollo de EICH por ser la principal complicación postrasplante. Por esta razón, en los últimos años se han realizado investigaciones para tratar de esclarecer los mecanismos genéticos, moleculares y celulares implicados en el desarrollo del EICL y la EICH (1,17,18).

1.2. Tipos de trasplante

TCHP puede ser categorizado en autólogo o alogénico con base a la fuente de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). En el trasplante autólogo, las células hematopoyéticas infundidas al paciente son ellos mismos, mientras que el trasplante alogénico 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, por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*), así como en 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) (10).

Los donadores en primera línea para el TCPH alogénico son los hermanos de los pacientes que poseen compatibilidad en HLA. Cuando no se cuenta con donadores alogénicos relacionados pueden ser empleados donadores compatibles en HLA no relacionados generalmente provenientes de bancos de donadores. 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 (10).

Entre hermanos sólo hay 25% de posibilidad de ser compatibles en la totalidad de los antígenos del locus HLA, 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. El tipo de trasplante que se realiza entre individuos compatibles en un solo haplotipo se conoce como trasplante haploidentico. Aunque el uso de donadores haploidenticos aumenta la probabilidad de donadores disponibles para trasplante, la probabilidad de desarrollo de EICH aumenta considerablemente (19).

Dentro de los estudios que se realizan al donador antes de la colecta de CPH se incluyen los mínimos necesarios tales como (11):

- Tipificación de los antígenos leucocitarios humanos, siendo los estudios mínimos compatibilidad en los alelos HLA-A, -B, -C, -DQ y DR, los cuales deben realizarse 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.

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 (20). 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 (19).

1.3. Enfermedad injerto contra hospedero (EICH)

Desde hace más de 60 años, el TCPH ha sido la principal terapia curativa para varias enfermedades hematológicas y desordenes genéticos, pero su eficacia es limitada por el desarrollo de una enfermedad secundaria llamada enfermedad injerto contra hospedero (EICH). En 1966, Billingham postuló tres requerimientos cruciales para el desarrollo de la EICH: a) el injerto debe contener células competentes inmunológicamente, b) el receptor debe ser incapaz de desencadenar una respuesta inmune efectiva para eliminar las células transplantadas, y c) el receptor debe expresar antígenos de tejido que no son expresados por el donador. Por consiguiente, aunque el sistema inmune normalmente sería capaz de rechazar células extrañas, el sistema inmune del receptor está comprometido inmunológicamente por la administración de agentes inmunoablativos (quimioterapia y/o radioterapia) por lo que es incapaz de rechazar células trasplantadas. Por tanto, los linfocitos T y otras células del sistema inmune del donador, los cuales son competentes inmunológicamente, reconocen antígenos presentes en tejido sano del receptor y desencadenan una reacción inmunológica en contra, dando lugar al desarrollo de EICH. De esta forma, la EICH es causada por mecanismos inflamatorios mediado por células aloreactivas frente al microambiente “extraño” en que se encuentran (17,21).

La EICH puede clasificarse en aguda y crónica, dependiendo de características como el tiempo de aparición y sintomatología clínica. Clásicamente, la EICH aguda ocurre dentro de los primeros 100 días postrasplante, mientras la EICH crónica se presenta posterior de los 100 días. La clasificación de EICH de acuerdo con la sintomatología clínica establece que la EICH aguda se presenta después del día 100 (como causa a la suspensión de los inmunosupresores o seguido de la ILD) o bien traslaparse con la EICH crónica (22). Esta clasificación de la enfermedad depende de las manifestaciones clínicas. La EICH aguda se caracteriza por daño en la piel, hígado, pulmón, timo, órganos linfoides y tracto gastrointestinal, mientras que la EICH crónica tiene manifestaciones más diversas parecidas a síndromes autoinmunes caracterizadas por lesiones tipo esclerodermifoides en la piel, así como disfunción de glándulas salivares y lagrimales, y la formación de auto anticuerpos (2).

1.3.1. EICH aguda

La EICH aguda es la principal complicación postrasplante. Esta enfermedad se presenta en 35 al 45% de los pacientes con compatibilidad 10/10 en HLA (17). La EICH aguda se subdivide en clásica (manifestaciones clínicas que ocurren antes de los 100 días postrasplante) y en persistente, recurrente o tardía (se presenta después de los 100 días postrasplante o posterior a la ILD, a menudo se presenta cuando se suspende la inmunosupresión) (23).

La EICH aguda puede cursar con diferente sintomatología clínica caracterizada por afectar principalmente piel, tracto gastrointestinal e hígado. En piel, esta enfermedad puede comenzar como erupciones maculopapulares en las orejas, palmas y plantas de los pies, los cuales pueden diseminarse a todo el cuerpo. En estadios más avanzados de la enfermedad, el salpullido puede causar foliculitis y parecerse a quemaduras de sol. En procesos extremos de la enfermedad, la piel puede ampollarse y ulcerarse. Estas manifestaciones clínicas ocurren como resultado de la degeneración vacuolar de la capa de células basales, queratinocitos disqueratóticos e infiltración de células mononucleares. En hígado, esta enfermedad se manifiesta por altos niveles de bilirrubina y fosfatasa alcalina en sangre. Estas manifestaciones clínicas se deben a que los linfocitos citotóxicos atacan el ducto biliar que está recubierto por células epiteliales causando endotelialitis, pericolangitis y destrucción apoptótica del ducto biliar. En tracto gastrointestinal, esta enfermedad se puede manifestar por diarrea voluminosa (más de 2 litros por día), dolor abdominal, vómito y anorexia. Estas manifestaciones clínicas son resultado de la ulceración y apoptosis de la base de las criptas, así como la pérdida de la superficie epitelial, células de Paneth y de células troncales (las cuales podrían dar lugar a la regeneración del epitelio) (21,24).

La EICH aguda puede clasificarse en grados I a IV dependiendo de la severidad de la enfermedad. El grado I es considerado leve, el grado II moderado, grado III severo, mientras que el grado IV se clasifica como muy severo. Entre los pacientes que experimentan TCPH, el 30 al 50% desarrolla EICH grado I y II, mientras que el 14% desarrolla EICH agudo grado III y IV. La EICH aguda severa tiene un mal pronóstico de

vida con un 25% de supervivencia a cinco años para pacientes con grado III, mientras que es de 5% para pacientes con grado IV (22).

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 (10).

Existen diversos factores de riesgo asociados al desarrollo de EICH aguda. Entre los cuales se encuentra el estatus de la enfermedad al momento del trasplante, incompatibilidad en HLA, edad del donador y receptor, donador no relacionado, incompatibilidad de género (donador mujer-receptor hombre), el uso de sangre periférica movilizada como fuente del injerto, intensidad del régimen de acondicionamiento y la ILD (22,25,26).

Fisiopatológicamente, la EICH aguda se desarrolla en tres estadios. Inicialmente, hay un daño al tejido ocasionado por la administración del régimen de acondicionamiento lo cual activa APCs del receptor. Posteriormente, las APC activan a las células T del donador hecho que se conoce como la fase aferente. Finalmente, en la fase eferente, los factores celulares e inflamatorios dañan órganos blancos (21).

- a) Daño por la administración del régimen de acondicionamiento: El régimen de acondicionamiento es crucial para erradicar la enfermedad de base y para permitir el injerto de células provenientes de un donador. Pretrasplante, el tejido de los pacientes se daña debido a factores como la enfermedad hematológica basal, la administración de quimio-radioterapia, infecciones y el régimen de acondicionamiento. Debido a los factores mencionados anteriormente, se origina una disrupción de la barrera epitelial, que permite la traslocación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés *pathogen-associated molecular pattern*), así como la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés *damage-associated molecular pattern*) los cuales desencadenan procesos inflamatorios característicos de la

EICH. Los DAMPs son moléculas secretadas al espacio extracelular solo cuando hay daño al tejido causando activación de la respuesta inmune. Por ejemplo, el ácido úrico, heparansulfato, inmunoglobulinas tipo lectina de unión a ácido siálico, componentes mitocondriales, IL-33, biglicano, metabolitos de adenosina trifosfato son considerados DAMPs. Estos DAMPs inducen la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1b, así como quimiocinas, que favorecen la sobre-expresión de moléculas de adhesión, moléculas del HLA, así como moléculas coestimuladoras en las APCs. Por otra parte, los PAMPs derivados de bacterias, hongos y virus que son reconocidos a través de receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés *Toll-like receptors*) y receptores tipo NOD (NLRs, por sus siglas en inglés *NOD-like receptors*), exacerbaban la activación de las APCs (Fig.1) (8,21,24).

- b) Fase aferente: activación de células T: Durante esta fase, las APCs migran del epitelio dañado hacia los nódulos linfoides donde inducen la activación de células T. En esta etapa las células T del donador proliferan y se diferencian (respuesta Th1/Th17) en respuesta a la activación de APCs. De este modo, la EICH se debe al reconocimiento y respuesta de células T del donador hacia proteínas definidas genéticamente en las células del receptor, por lo que puede estar dirigido contra antígenos HLA y/o antígenos menores de histocompatibilidad. Por consiguiente, se ha descrito que ante la incompatibilidad en moléculas HLA de clase I se desencadena una respuesta inmune mediada esencialmente por células T CD8⁺, mientras que la incompatibilidad en HLA clase II desencadena una respuesta inmune mediada principalmente por células T CD4⁺. Para los pacientes con compatibilidad en HLA, tanto linfocitos T CD4⁺ como T CD8⁺ pueden responder a disparidades entre antígenos menores de histocompatibilidad, los cuales son proteínas derivadas de genes polimórficos de tejido y presentados sobre moléculas del HLA clase I o clase II por APCs del donador o receptor (presentación indirecta y directa, respectivamente). Por tanto, la presentación y exposición a aloantígenos es ilimitada, lo cual ocasiona una inflamación sistémica exacerbada. Finalmente, la activación de las células de la respuesta inmune conlleva al inicio de cascadas intracelulares que inducen la transcripción de genes

para citocinas y sus receptores. Dentro de las citocinas que se sobreexpresan en la EICH se encuentran las de tipo Th1 como IFN- γ , IL-2 y TNF- α las cuales participan tanto en el desarrollo de la enfermedad como en su control. Por ejemplo, aunque la IL-2 es una citocina esencial para la función efectora de las células T, esta citocina también resulta esencial para la generación y mantenimiento de células T reguladoras. Por otra parte, el IFN- γ aumenta la sensibilidad de monocitos y macrófagos ante estímulos como lipopolisacáridos, síntesis de óxido nítrico y la expresión de moléculas esenciales (receptores de quimiocina, HLA y moléculas de adhesión). En contraste, la exposición prolongada a niveles altos de IFN- γ puede inducir la apoptosis de células T ayudando a resolver la enfermedad. Por tanto, el tiempo y la duración de la secreción de cierta citocina puede dictaminar sus efectos específicos en el desarrollo, severidad y la resolución de la EICH (Fig.1) (2,3,8,21,22,24,27).

- c) Fase eferente, apoptosis de células blanco: Esta fase comprende una cascada compleja de quimiocinas y citocinas inflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 y óxido nítrico, así como mediadores celulares como linfocitos T citotóxicos o células NK. De esta forma, diferentes quimiocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α , CCL5, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL17 y CCL27 promueven la migración de estas células aloreactivas a órganos blanco. Las citocinas proinflamatorias sinergizan con las células citotóxicas para favorecer el daño y la disfunción del tejido blanco. Además, la traslocación de PAMPs durante el régimen de acondicionamiento induce la activación de células mononucleares (monocitos/macrófagos), así como la secreción de citocinas, lo cual amplifica y propaga la reacción inflamatoria. Por otra parte, los principales efectores celulares de EICH aguda son los linfocitos T citotóxicos y NK a través de diferentes vías como la secreción de TNF- α , FASL y la liberación del contenido de sus gránulos citotóxicos que contienen granzima (serinproteasa) y perforina (proteína citolítica formadora de poros). En este contexto, las vías de inducción de apoptosis son diferentes dependiendo del órgano blanco. Por ejemplo, la vía Fas/FasL parece ser esencial para la lisis de hepatocitos, mientras que la vía perforina/granzima parece ser esencial en el desarrollo de la enfermedad a nivel intestinal. Por tanto,

todos los mediadores inflamatorios mencionados anteriormente sinergizan para amplificar el daño al tejido, promover la inflamación y destruir el tejido blanco (Fig.1) (21,22,27).

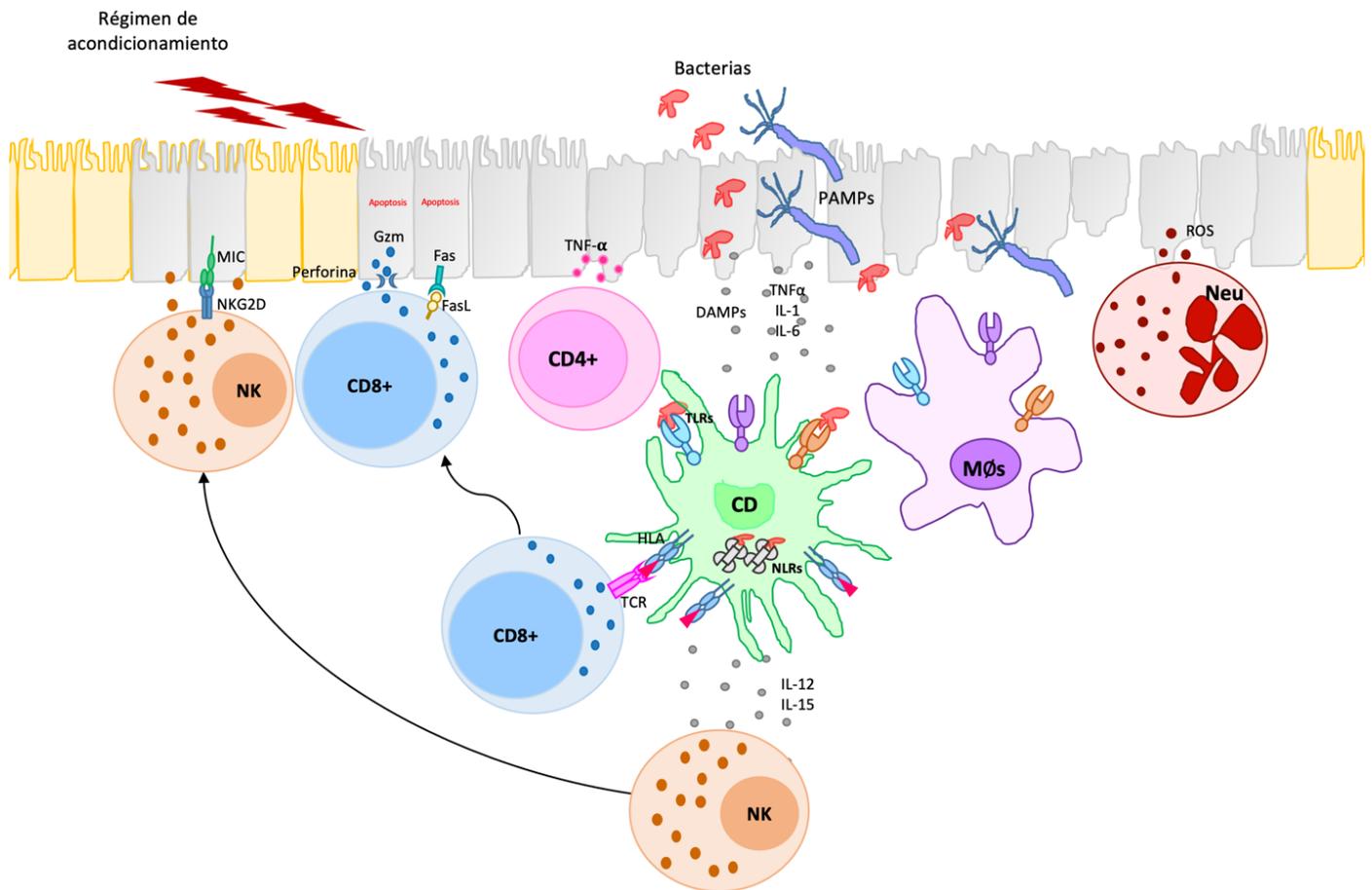


Figura 1. Fisiopatología de la enfermedad injeto contra hospedero (EICH) aguda.

El régimen de acondicionamiento conduce al daño y destrucción de la barrera epitelial. El tejido epitelial dañado libera DAMPs (ácido úrico, ATP, etc.) y permite la translocación de PAMPs, los cuales favorecen la síntesis y secreción de citocinas proinflamatorias. Dado el microambiente inflamatorio, las células presentadoras de antígenos (APCs) se activan. Las APCs activadas inducen la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T en Th1 y Th17, los cuales favorecen la activación de los principales efectores de la enfermedad: linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y NK. Finalmente, las células efectoras y las citocinas proinflamatorias median el daño al tejido epitelial en piel, hígado, pulmón, tracto gastrointestinal, etc.

1.2.2. EICH crónica

La EICH crónica es la principal causa de morbilidad y mortalidad no asociada a recaída en pacientes posterior al TCPH (28). De esta manera, la EICH es una complicación muy frecuente posterior al trasplante ya que se presenta en el 30 al 70% de los pacientes (25). Esta enfermedad puede ser progresiva (activa o aguda que emerge en crónica), quiescente (enfermedad aguda se resuelve completamente pero es seguida con enfermedad crónica) o de *novo* (se presenta sin ninguna característica clínica de la enfermedad aguda) (24).

La EICH es una enfermedad con sintomatología clínica variable pero que clínicamente presenta manifestaciones parecidas a desordenes inmunológicos o autoinmunes (29). Por este motivo, la EICH cónica se considera una enfermedad sistémica con manifestaciones clínicas como fibrosis, escleroderma y/o bronqueolitis obliterante de manera que se afectan diferentes órganos y tejidos (3). En la piel, aparece despigmentación, alopecia, poiquiloderma, erupciones planas tipo liquen o con características escleróticas, mientras que en uñas puede causar distrofia o pérdida de estas. En boca, se manifiesta xerostomía (sensación de carencia de saliva), úlceras, lesiones tipo liquen y restricción en la apertura de la boca por la esclerosis. En ojos, la enfermedad se caracteriza por síntomas de sequedad ocular, síndrome sicca (que involucra la sensación de ojo seco por destrucción de glándulas lagrimales) y conjuntivitis cicatricial. A nivel muscular, esta enfermedad presenta fascitis, miositis (inflamación de los músculos) y rigidez en articulaciones. En tracto GI, los síntomas incluyen anorexia, pérdida de peso y estenosis esofaríngea. En pulmón, se origina bronqueolitis obliterante y efusiones pleurales. En hígado causa ictericia y transaminasemia. Finalmente, la EICH crónica produce manifestaciones en otros órganos como en corazón (pericarditis), riñones (síndrome nefrótico), médula ósea (trombocitopenia, anemia y neutropenia) y en el caso de pacientes mujeres puede manifestarse sintomatología a nivel genital (esclerosis, ulceraciones y resequedad vaginal (23,24).

Con base en lo mencionado anteriormente, la EICH crónica puede categorizarse de acuerdo a los órganos afectados y la severidad de afectación órgano-específica. Por

consiguiente, la EICH crónica puede clasificarse como leve, moderada y severa (23). En pacientes con EICH crónica, se ha descrito que el 10% desarrollan enfermedad leve, 59% moderada y 31% severa, lo cual correlaciona con un 97%, 86% y 62% de supervivencia a dos años postrasplante respectivamente (28).

Existen diversos factores de riesgo asociados con el desarrollo de EICH crónica. Dentro de estos factores de riesgo se encuentran la EICH aguda, la incompatibilidad HLA, la edad del donador y receptor, la presencia de células T en el injerto, donador mujer en paciente hombre, donador mujer múltipara, injerto de sangre periférica movilizada, injerto de sangre de cordón umbilical, infección viral postrasplante, el régimen de acondicionamiento y la ILD (28,30).

La fisiopatología de la EICH crónica se caracteriza por la generación de células aloreactivas, lo que fundamenta la semejanza de esta enfermedad con trastornos autoinmunes. La administración del régimen de acondicionamiento, así como la EICH aguda ocasionan atrofia tímica y generación de células T aloreactivas. Durante la EICH aguda, los linfocitos T CD8⁺ preferencialmente lesionan células epiteliales medulares tímicas, lo que induce la generación de células T aloreactivas derivadas de progenitores provenientes del donador, las cuales maduraron en el timo dañado del receptor y no tuvieron un proceso adecuado de selección negativa (2,3,31). También el desarrollo de células B se modifica por afectarse la médula ósea y ser el nicho de células B, así el proceso de maduración de estas células se compromete dando como resultado la generación de células B auto y aloreactivas (21). Además, durante el desarrollo de EICH aguda se presenta elevada diferenciación y supervivencia de células B aloreactivas (32). De esta manera, se produce una reacción robusta de centro germinal que da lugar a la secreción y producción de autoanticuerpos durante el desarrollo de esta enfermedad (33). Existen dos clases de anticuerpos aloreactivos que se han asociado con el desarrollo de EICH aguda. El primer tipo incluye anticuerpos dirigidos contra antígenos del receptor que no están presentes en el donador, por ejemplo anticuerpos dirigidos contra proteínas codificadas en el cromosoma Y, los cuales se detectan en 80% de los pacientes hombres con EICH crónica trasplantados de donador mujer. El segundo tipo de anticuerpos está dirigido contra aloantígenos que corresponden a proteínas no polimórficas entre donador

y receptor, por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento de plaquetas (PDGFR, por sus siglas en inglés *platelet derived growth factor receptor*). Estos anticuerpos que reconocen al PDGFR inducen la fosforilación y acumulación de especies reactivas de oxígeno, así como la expresión del gen de colágeno tipo I a través de la vía de señalización Ha-Ras-ERK1/2-ROS. Por tanto, la función biológica de estos anticuerpos se ha relacionado con desarrollo de fibrosis de órganos blanco (33). En cuanto a la esclerosis, durante este proceso ocurre una cicatrización defectuosa con incrementada producción de citocinas escleróticas como TGF- β y PDGF. Sin embargo, evidencia reciente destaca la participación de la subpoblación Th17 en este proceso (21). En cuanto a la EICH crónica liquenoide, se asocia con la sobreexpresión de citocinas y quimiocinas tipo Th1/Th17, así como elevados números de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ e IL-17. Adicionalmente, la incapacidad tímica en la EICH crónica ocasiona baja frecuencia de células T reguladoras, y estas muestran incrementada apoptosis mediada por Fas (28) (Fig. 2).

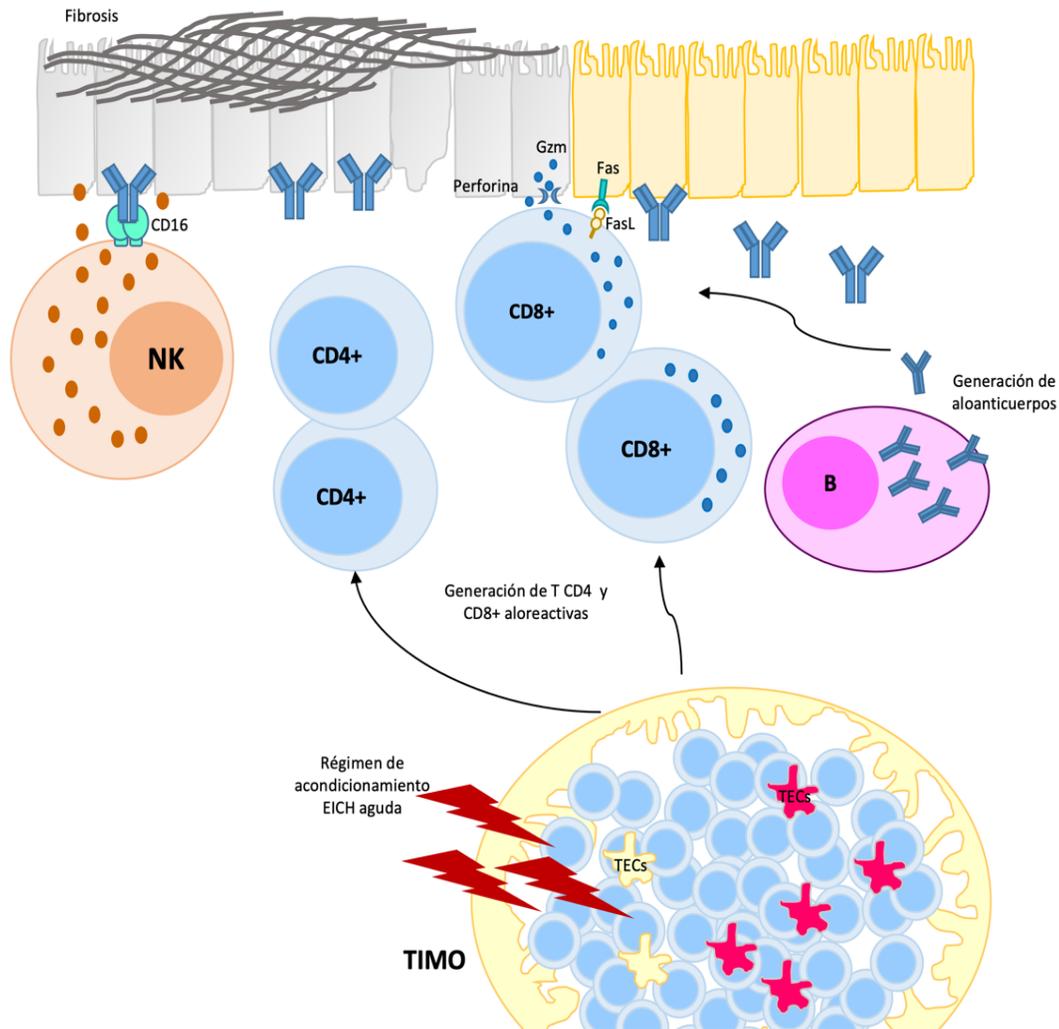


Figura 2. Fisiopatología de la EICH crónica.

El régimen de acondicionamiento y la EICH aguda ocasionan daño las células epiteliales del timo (TECs) lo cual incapacita la selección negativa e induce la generación de células T alorreactivas que perpetúan el daño a timo favoreciendo el desarrollo de la enfermedad crónica. Por otra parte, durante el desarrollo de EICH aguda se presenta elevada diferenciación, sobrevida de células B alorreactivas, así como la producción de alo-anticuerpos. Finalmente, los anticuerpos producidos durante el desarrollo de esta enfermedad se depositan en órganos blanco se presenta infiltración de células T CD4⁺ y B está asociada con la fibrosis de órganos blanco.

1.4. Células NK

Las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés *Natural Killers*) son linfocitos granulares grandes del sistema inmune innato con capacidad citotóxica espontánea, es decir que no requieren inmunización previa y cuya función efectora no se restringe al reconocimiento de moléculas del MHC. La función esencial de las células NK es el reconocimiento y eliminación de células que experimentan procesos de estrés como infección por virus, bacterias, parásitos o transformación neoplásica (34). Las células NK representan de 5 al 15% de los linfocitos y están presentes más abundantemente en otros tejidos como piel, intestino, hígado, pulmón, útero, riñón y articulaciones. Similar a las células B y T, las células NK se desarrollan a partir de un progenitor linfoide común principalmente en médula ósea, aunque también se ha reportado que su desarrollo puede llevarse a cabo en hígado y timo. Durante su evolución, las células NK transitan a través de diferentes estadios de maduración, expansión y adquisición de receptores específicos los cuales se expresan por línea germinal. Como células maduras, la activación y función efectora de las células NK depende de la integración de señales derivadas de receptores de activación y de inhibición presentes en su superficie celular (35).

Existen diferentes hipótesis de los mecanismos de activación de las células NK. El primer mecanismo es el “reconocimiento de lo propio” el cual se basa en que las moléculas de MHC de clase I en células autólogas son reconocidas a través de receptores de inhibición como los receptores KIR y NKG2A presentes en células NK inhibiendo su activación. El segundo mecanismo es la “pérdida de lo propio” en el cual las células NK reconocen células autólogas que disminuyen o pierden la expresión de moléculas del MHC de clase I, lo que induce su activación. El tercer mecanismo es la “inducción de lo propio”, el cual establece que las células NK reconocen ligandos de activación expresados en células blanco bajo procesos de estrés celular (infección o transformación neoplásica). Este reconocimiento se lleva a cabo mediante receptores de activación expresados por línea germinal como NKG2D que desencadenan la activación celular. Finalmente, el mecanismo de lo “no propio” en el que se establece que las células NK son capaces de

reconocer células alógenas (provenientes de un donador) como resultado de la incompatibilidad en moléculas del MHC entre donador y receptor (36) (Fig. 3).

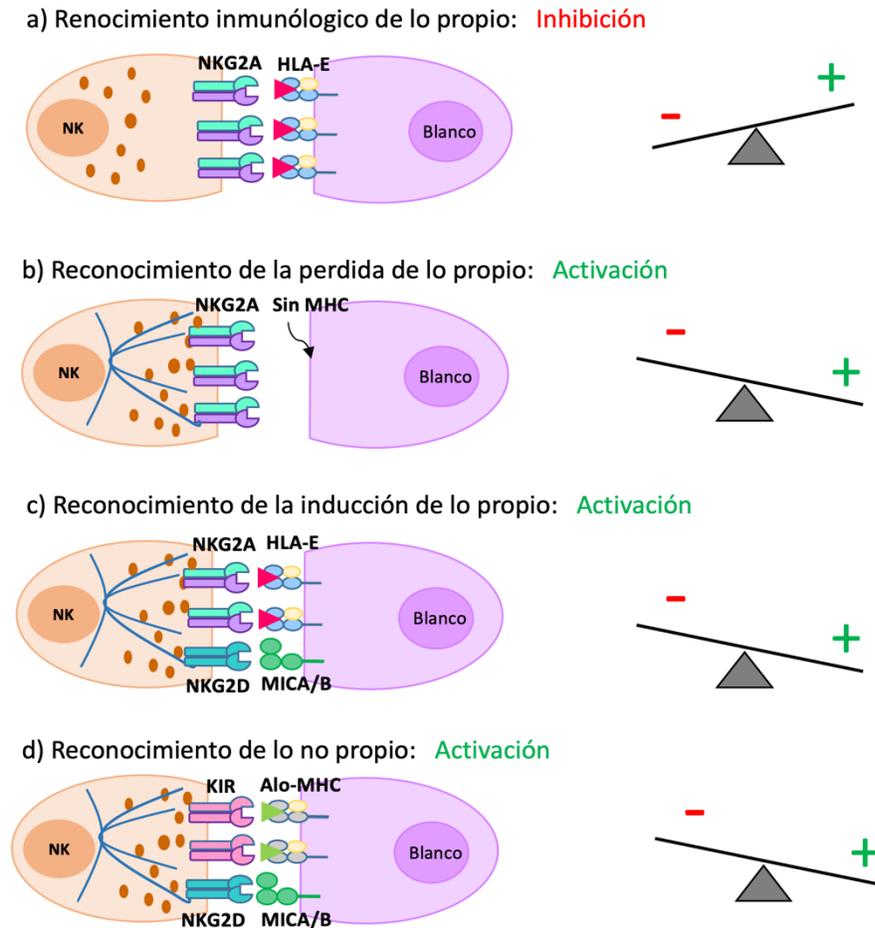


Figura 3. Mecanismos de reconocimiento inmunológico por células NK.

a) Reconocimiento inmunológico de lo propio: Las células NK reconocen células autólogas que expresan moléculas de MHC (HLA-E) mediante receptores de inhibición como NKG2A para contener su activación, **b)** Reconocimiento de la pérdida de lo propio: Las células NK reconocen células blanco que disminuyen o pierden la expresión de moléculas de MHC lo cual desencadena su activación, **c)** Inducción de lo propio: Las células NK reconocen ligandos de activación que son expresados por células blanco mediante receptores de activación (NKG2D) lo que induce su activación, y **d)** Reconocimiento de lo no propio: Las células NK reconocen células provenientes de un donador (alógenas) debido a su incompatibilidad en moléculas del MHC desencadenando su activación.

Posterior a la activación, la función efectora de las células NK consiste en la secreción de citocinas, así como el reconocimiento y eliminación de células blanco. Las células NK producen y secretan una gama de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias dependiendo del microambiente inflamatorio. Estas citocinas incluyen IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, (por sus siglas en inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), IL-10, IL-5, IL-13 para la activación de células T, así como otras células del sistema inmune innato como células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. Además, las células NK secretan quimiocinas como CCL1, CCL2, CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) y CXCL8 (IL-8) las cuales pueden atraer linfocitos efectores y células mieloides al sitio de inflamación. Con base en lo anterior, las células NK pueden modular la función de otras células efectoras tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta inmune adaptativa (35,36). Por otra parte, las células NK reconocen y eliminan células blanco mediante dos mecanismos principales: la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés *antibody dependent cell cytotoxicity*) y la citotoxicidad natural. La ADCC permite el reconocimiento y eliminación de células opsonizadas con anticuerpos mediante el receptor de baja afinidad para la fracción cristalizable de IgG Fc γ RIIIA (CD16). A pesar de que las células NK no expresan receptores “antígeno específicos”, las células NK expresan una amplia variedad de receptores que les permite reconocer células blanco directamente para ejercer la citotoxicidad natural. La integración de las señales recibidas mediante sus receptores determina la respuesta de las células NK (34).

La citotoxicidad de las células NK depende de la liberación de gránulos citotóxicos hacia las células blanco durante la sinapsis inmunológica. La liberación de gránulos citotóxicos requiere la reorganización del citoesqueleto de las células NK incluyendo la polimerización de actina, así como la polimerización del centro de organización de microtúbulos. Los gránulos líticos viajan a través de los microtúbulos y una vez en el sitio de sinapsis se fusionan con la membrana de la célula blanco y liberan enzimas para facilitar la activación de la apoptosis intrínseca en la célula blanco. Las moléculas que incluyen el gránulo lítico contienen perforina la cual es una glicoproteína de 60 a 70 kDa formadora de poros, la granzima B es una serin-proteasa, FasL (CD178), TRAIL (CD253)

y granzima B y la perforina son un componente esencial de los gránulos líticos debido a que escinden péptidos después de residuos de ácido aspártico. Una vez dentro de las células blanco la granzima B desencadena la apoptosis mediante mecanismos dependientes (escinde caspasa 3 y caspasa 8) e independientes de caspasas (induce la liberación de citocromo C de la mitocondria a través de la ruptura proteolítica de la proteína anti apoptótica Bid). Fenotípicamente, las células NK humanas se caracterizan por el fenotipo CD3⁻CD56⁺, así como la expresión del marcador CD16^{+/-} (35,36).

1.5. Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos son células del sistema inmune adaptativo las cuales son considerados los efectores esenciales en la respuesta inmune contra cáncer y constituyen parte esencial de la inmunoterapia contra esta enfermedad. Los linfocitos T CD8⁺ *naïve* censan efectivamente el material extraño, mientras que las células efectoras constituyen efectores con alta capacidad de migración para la inmunovigilancia y el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa contra infección o cáncer (37).

Los linfocitos T citotóxicos se diferencian a partir de un progenitor linfoide común (CLP, por sus siglas en inglés *common lymphoid progenitor*), el cual es un progenitor inmaduro derivado de médula ósea. El CLP migra desde la médula ósea al timo debido al efecto de agentes quimiotácticos y factores tímicos (la timotaxina, timosina y timopoyetina). Dentro del timo, el microambiente induce la expresión del TCR y CD en estas células inmaduras para permitir su interacción con moléculas del MHC de clase I y clase II lo cual permite identificar la reactividad de estas células e inducir su maduración a través de procesos de selección. Durante el proceso de selección positiva, los linfocitos T que se unen al menos con poca afinidad a moléculas del MHC de clase I y 2 son identificadas, mientras que el proceso de selección negativa induce la apoptosis de células T que tienen afinidad por péptidos propios presentados sobre moléculas del MHC de clase I y 2, lo cual elimina clonas autorreactivas. Como resultado de este proceso de maduración, los linfocitos T que presentan afinidad por MHC de clase I se convierten en células T CD8⁺, mientras que los linfocitos con afinidad por MHC de clase II se convierten en células T CD4⁺ (37).

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos son la principal población celular encargada de la eliminación de patógenos y células neoplásicas, siendo los linfocitos T CD4+ esenciales para el mantenimiento de la respuesta CD8+, así como para la prevención de exhaustación (37). La activación de los linfocitos T CD8+ se desencadena a partir del reconocimiento de péptidos antigénicos presentados por moléculas del MHC de clase I en la superficie de APCs. En este contexto, los linfocitos T CD8+ migran hacia gradientes de quimiocinas e integrinas secretadas y/o presentadas en APCs o células blanco, para formar una sinapsis inmunológica entre el complejo de activación supramolecular del linfocito y moléculas de adhesión en la superficie de células blanco (37).

La activación del TCR induce la activación del linfocito. El TCR es una estructura compleja que comprende una subunidad de unión al antígeno (TCR $\alpha\beta$) que se une no covalentemente a tres subunidades de señalización de co-receptor CD3 ($\zeta\zeta$, CD3 $\delta\epsilon$ y CD3 $\gamma\epsilon$) las cuales contienen en su región citoplasmática inmunoreceptores con motivos de activación basados en tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) necesarios para la expresión en superficie celular de TCR, el ensamblaje intracelular y el inicio de la vía de señalización (38,39). Tanto las cadenas α y β del TCR contienen dominios variables tipo inmunoglobulina (dominios V) que determinan la especificidad del antígeno, así como dominios constantes (dominios C), una región de anclaje a la membrana, una región transmembrana y un dominio citoplasmático corto el cual carece de motivos que permitan la señalización intracelular. Por tanto, la señalización intracelular depende de el complejo CD3, pero requiere la iniciación y amplificación del CD8. Adicionalmente, CD45 es una de las glicoproteínas más abundantes en la superficie de células T, la cual actúa como un regulador positivo de la señalización por TCR por defosforilización de la cinasa Lck y su activación que permite la fosforilización de las cadenas $\zeta\zeta$ para la inducción de señalización río abajo (40). La unión del TCR $\alpha\beta$ con el complejo peptido-MHC de clase I conduce a la fosforilación de los dominios ITAM de las subunidades de señalización. El TCR se une a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 3$ del MHC I donde se encuentra anclado el péptido antigénico, mientras que el CD8 es un co-receptor presente en la superficie de células T como un homodímero $\alpha\alpha$ o como un heterodímero $\alpha\beta$ que se une al dominio $\alpha 3$ del MHC I. Por

tanto, la asociación de CD8 al MHC I permite aumentar la firmeza de la interacción TCR-MHC I incrementando hasta 100 veces la sensibilidad del TCR hacia el complejo péptido-MHC I (41). Aunque la activación de los linfocitos T CD8+ requiere la señalización por TCR, también se requiere la activación de una señal de co-estimulación independiente sin la cual los linfocitos T CD8+ se volverían anérgicos y experimentarían apoptosis. Esta segunda señal generalmente mediada por receptores CD28 en células T CD8+ que tienen como ligando a CD80/B7.1 y CD80/B7.2 expresadas en APCs, es esencial en determinar la sensibilidad del linfocito CD8+ debido a que disminuye el umbral de estimulación, mejora la proliferación celular y la producción de citocinas. Posterior a la activación de CD28, los residuos de tirosina intracelulares son fosforilados permitiendo el reclutamiento de PI3K (Por sus siglas en inglés, phosphatidylinositol 3-kinase). La activación de PI3K promueve la activación de la proteína cinasa B (PKB por sus siglas en inglés, *protein kinase B*) y el factor nuclear κ B (NF- κ B, por sus siglas en inglés *nuclear factor- κ B*), culminando en la sobre-expresión de Bcl-xL e incremento en la supervivencia de los linfocitos T. Además, la activación de los linfocitos T induce la maquinaria necesaria para la eliminación de células blanco (37,42,43).

Cuando una célula blanco es reconocida por un linfocito T CD8+ esta es eliminada. La interacción de linfocitos T citotóxicos y células blanco induce fuerzas mecánicas que favorecen la formación de poros en la membrana de células blanco mediante la secreción de gránulos líticos los cuales contienen perforinas, granzimas, perforinas, cathepsina C y granzulina las cuales colectivamente inducen la apoptosis de la célula blanco. Alternativamente, el complejo granzulina, perforina y granzima es ingerido por células blanco a través de la endocitosis de la membrana de linfocitos T citotóxicos. Posteriormente, la granzulina y perforina crea poros en la membrana endosomal y la liberación de granzimas en el citoplasma. Además, Fas ligando es expresado en linfocitos T CD8+ y su interacción con el receptor Fas en células blanco activa los dominios de muerte (FADD, de las siglas en inglés *Fas-associated protein with death domains*) los cuales activan caspasas y endonucleasas conduciendo a la fragmentación de el DNA de células blanco (44).

1.6. Receptores NKG2

Los receptores NKG2 pertenecen a la superfamilia de receptores lectina tipo C que se expresan constitutivamente en células NK, así como en una subpoblación de linfocitos T CD8⁺. Esta familia está constituida por siete receptores NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F y NKG2H, los cuales forman heterodímeros con la cadena invariante CD94 unidos por puentes disulfuro. Sin embargo, el receptor NKG2D es la excepción por formar una estructura homodimérica. CD94 tiene un dominio citoplasmático corto, sin dominios citoplasmáticos funcionales. Por otra parte, los receptores NKG2 presentan diferentes dominios: un dominio extracelular parecido a lectina C que le permite la interacción con su respectivo ligando, un dominio transmembranal que funciona para anclarse a la membrana de la célula efectora y un dominio citoplasmático para la señalización intracelular, que dependiendo de las características del dominio citoplasmático presente en cada receptor será su función (activación o inhibición) (45).

Los receptores heterodiméricos de la familia NKG2 tienen como ligando a las moléculas del MHC no clásicas de clase I HLA-E, la cual se distingue por ser una molécula poco polimórfica y con patrón de expresión ubicua. Al igual que otras moléculas del MHC de clase I, HLA-E se compone de una cadena pesada, β 2 microglobulina y es capaz de presentar péptidos derivados de secuencias líder de las moléculas del MHC de clase I. El reconocimiento inmunológico del HLA-E permite a las células NK monitorear indirectamente el nivel de expresión del MHC en células blanco. Aunque los receptores NKG2A y NKG2C se unen al mismo ligando, se trata de NKG2A quien posee mayor afinidad por HLA-E en contraste de NKG2C. Por tal motivo, se ha postulado que la interacción diferencial entre NKG2A y NKG2C depende del reconocimiento directo del péptido presentado por la molécula HLA-E (45,46).

En este sentido, los genes que codifican para los receptores NKG2 se encuentran en la región NKC (por sus siglas en inglés *natural killer-gene complex*), que está ubicada en el brazo corto del cromosoma 12, con una extensión aproximada de 2.5 Mb. Dada la alta similitud en organización, secuencia y organización transcripcional, entre los genes que

codifican para los receptores NKG2A, -C, -E y -F, se ha postulado que estos genes evolucionaron a través de mecanismos de duplicación génica consecutiva (46).

1.6.1. NKG2A

Los transcritos codificados NKG2A y NKG2B son productos del proceso de *splicing* alternativo del mismo gene *KLRC1*. Ambos receptores poseen dos dominios citoplasmáticos ITIM (por sus siglas en inglés, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*), de modo que son categorizados como receptores de inhibición. NKG2A señala a través de sus motivos ITIM presentes en su región citoplasmática. Después de la interacción con el ligando HLA-E, los ITIM se fosforilan y reclutan las siguientes fosfatasa: fosfatasa 1 que contiene tirosina con homología Scr (SHP-1, por sus siglas en inglés *Scr homology-containing tyrosine phosphatase 1*), SHP-2 y la fosfatasa 5 inositol que contiene un dominio SH2 (SHIP, por sus siglas en inglés de *lipid phosphatase SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase*). La función de dichas fosfatasas es neutralizar las señales de activación. Por consiguiente, la señalización de NKG2A permite que las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 defosforilen a las regiones ITAM e inhiban la señalización río abajo (35,47) (Fig. 4).

El receptor NKG2A tiene como ligando a las moléculas de HLA-E. Como se describió en la sección anterior, HLA-E es una molécula de MHC de clase I no clásica la cual presenta péptidos derivados de las secuencias líder de las moléculas de MHC (48).

1.6.2. NKG2C

NKG2C (Por sus siglas en inglés, *natural killer group 2, member C*) es un receptor de la familia NKG2. Este receptor se asocia con la molécula adaptadora DAP12 por tener un dominio intracelular corto. La interacción entre el receptor NKG2C y la molécula del MHC, HLA-E promueve la fosforilación de las regiones ITAM en la molécula adaptadora DAP12 para el reclutamiento de las moléculas Syk y ZAP70. Mientras que la vía de señalización río abajo induce la activación de las moléculas adaptadoras LAT y SLP-76 (Por sus siglas en inglés, *SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kD*) desencadenando la activación celular (34) (Fig. 4).

1.6.3. NKG2D

El receptor de activación NKG2D (Por sus siglas en inglés, *natural killer group 2, member D*) es una glicoproteína transmembrana tipo 2 que pertenece a la familia NKG2. Este receptor se expresa como un homodímero con un dominio intracelular corto que no permite desencadenar el proceso de señalización, por ese motivo se acopla a la proteína adaptadora transmembrana de activación 10 DNAX (DAP10, por sus siglas en inglés *DNAX-activating protein 10*). DAP10 contiene en su región citoplasmática un dominio ITAM, cuya función es reclutar a la cinasa 3 de fosfoinositol (PI3K, por sus siglas en inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*) y la proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento (Grb2, por sus siglas en inglés *growth factor receptor-bound protein 2*). La fosforilación de Grb2 induce la fosforilación de Vav1, PLC- γ 2 y SLP-7. Además, PI3K y Grb-Vav1 inducen la fosforilación de Jak2, STAT5, Akt, MEK1/2 y ERK. Por lo tanto, la interacción NKG2D con sus respectivos ligandos induce la respuesta mediante la secreción de citocinas, quimiocinas, proliferación y supervivencia de las células efectoras, así como la citotoxicidad de células blanco (35,49–51) (Fig. 4).

El receptor NKG2D se expresa constitutivamente en células NK, así como en otras células de la respuesta inmune como células T CD8⁺, linfocitos T $\gamma\delta$, NKT, y algunas poblaciones de linfocitos T CD4⁺:

- a) **Linfocitos T CD8⁺**: Las células T CD8⁺ son la principal población linfoide que expresa NKG2D. En humanos, los linfocitos TCD8⁺ expresan constitutivamente el receptor NKG2D y posterior a la unión con su respectivo ligando, la señalización de este receptor es mediada por la molécula adaptadora DAP10. En linfocitos T CD8⁺, NKG2D funciona como un receptor de coestimulación en la señal inducida por TCR; porque DAP10 tiene un motivo de señalización similar a CD28. De esta forma, ambos inducen efectos similares en la coestimulación en células T (49,52–55). Sin embargo, se ha reportado que NKG2D también funciona como un receptor de activación en células T CD8⁺ bajo ciertas condiciones, entre las que destaca la exposición prolongada de IL-15 (56,57). Además, la señalización por IL-15 presenta sinergismo con la señalización de NKG2D a través de la activación

de PI3K, JNK, ERK y cPLA2, permitiendo que NKG2D regule la activación directa y la citotoxicidad independiente de la señal de TCR (58,59). Finalmente, se ha reportado que la activación vía NKG2D en células T CD8⁺ es importante para la supervivencia y la formación de células de memoria (49,60).

- b) **Linfocitos T $\gamma\delta$:** Los linfocitos T $\gamma\delta$ comprenden una pequeña población de las células de sangre periférica (2 al 5%) aunque son abundantes en tejidos, particularmente en intestino delgado, tracto reproductivo y piel. Estas células expresan constitutivamente NKG2D en su superficie, que se une a DAP10 a través de su región citoplasmática. La interacción NKG2D-NKG2DL desencadena la lisis de la célula blanco, lo que ha sugerido que estas células también puedan tener un efecto de coestimulación con la señal del TCR. Otra función importante de los linfocitos T $\gamma\delta$ es que reconocen NKG2DL expresados en células de cáncer, desencadenando su citotoxicidad contra estas células blanco, como es el caso de las células de linfoma, leucemia y tumor sólido (49,61–63).
- c) **Células NKT:** Las células NKT representan una pequeña población de los linfocitos T de sangre periférica (0.01-1%), pero es una población enriquecida en hígado. La expresión de NKG2D en estas células se restringe a aquellas que son CD4⁻, las cuales muestran un perfil parecido a las células Th1. Con respecto a su función, se ha descrito que NKG2D actúa como una señal de co-estimulación en respuesta a una señal sub-óptima, desencadenada por anti-CD3 o ligandos presentados por CD1d. Sin embargo, también se ha reportado que la estimulación de NKG2D inicia la lisis de células blanco independientemente de la estimulación de TCR, demostrando así el efecto dual que puede tener este receptor. Funcionalmente, la activación del receptor NKG2D en células NKT induce citotoxicidad contra célula blanco (49).
- d) **Linfocitos T CD4⁺:** Las células T CD4⁺ no expresan NKG2D bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas como artritis reumatoide se han encontrado células T CD4⁺ NKG2D⁺; probablemente como resultado de los niveles altos de TNF- α e IL-15 presentes en esta enfermedad.

Además, las células T CD4⁺NKG2D⁺ se asocian con otras enfermedades autoinmunes, como la enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener, diabetes tipo 2, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico. En cáncer, las células T CD4⁺NKG2D⁺ son muy frecuentes en pacientes con tumores que expresan el ligando del receptor NKG2D, como en carcinoma cervical. Con base en lo anterior, se propuso que existen dos distintas poblaciones de células T CD4⁺NKG2D⁺. Una de ellas presenta un perfil secretor de citocinas inflamatorias y características citotóxicas, mientras que la otra presenta características de inmunoregulación (64). En cuanto a la función de NKG2D en células T CD4⁺, se asocia como un co-estimulador de la respuesta mediada por TCR que desencadena citotoxicidad celular (49).

El receptor NKG2D reconoce como ligandos diversas proteínas que presentan similitud estructural con las moléculas del MHC de clase I. Estos ligandos se agrupan en dos familias: (a) las moléculas A y B parecidas a moléculas MHC de clase I (MICA y MICB, por sus siglas en inglés *MHC-class-I-polypeptide-related sequence A and B*) y (b) la familia de proteínas de unión a UL-16 de citomegalovirus (ULBP, por sus siglas en inglés *UL-16 binding protein*). Las moléculas MICA/B tienen dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ que son parecidos a dominios tipo inmunoglobulina, carecen de interacción con $\beta 2$ -microglobulina y no presentan péptidos antigénicos. Por otra parte, la familia de proteínas ULBPs se compone de 6 miembros (ULBP-1 a -6), los cuales expresan dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, pero carecen del dominio $\alpha 3$, así como de la interacción con $\beta 2$ -microglobulina y presentación de péptidos antigénicos. Particularmente, las moléculas ULBP -1, -2, -3 y -6 son ligandos de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI, del inglés *glycosylphosphatidylinositol*) mientras que ULBP -4 y -5 tienen un dominio transmembranal y una cola citoplasmática.

Inicialmente la expresión de los ligandos del receptor NKG2D fue atribuida a células bajo procesos de estrés celular, como en células con infección o transformación neoplásica. Sin embargo, evidencia más reciente indica que estos ligandos también se expresan bajo condiciones homeostáticas, usualmente en procesos de desarrollo, así como en activación y proliferación celular. Por ejemplo, macrófagos y células dendríticas activadas

expresan estos ligandos como un mecanismo adicional para regular la respuesta de células T (65).

A pesar de que NKG2D es un receptor muy conservado, este receptor reconoce ligandos muy polimórficos. Por consiguiente, se ha descrito que la presión de selección evolutiva ha inducido la diversificación de ligandos del receptor NKG2D. La diversificación de ligandos se postula como un mecanismo por el cual células en procesos de transformación neoplásica o infección intentan evadir el sistema inmune. Por tanto, NKG2D es un receptor poco polimórfico con alta conservación evolutiva, que tiene como ligandos a una variedad de moléculas inducidas en condiciones de estrés, las cuales muestran alto grado de polimorfismo (55,66).

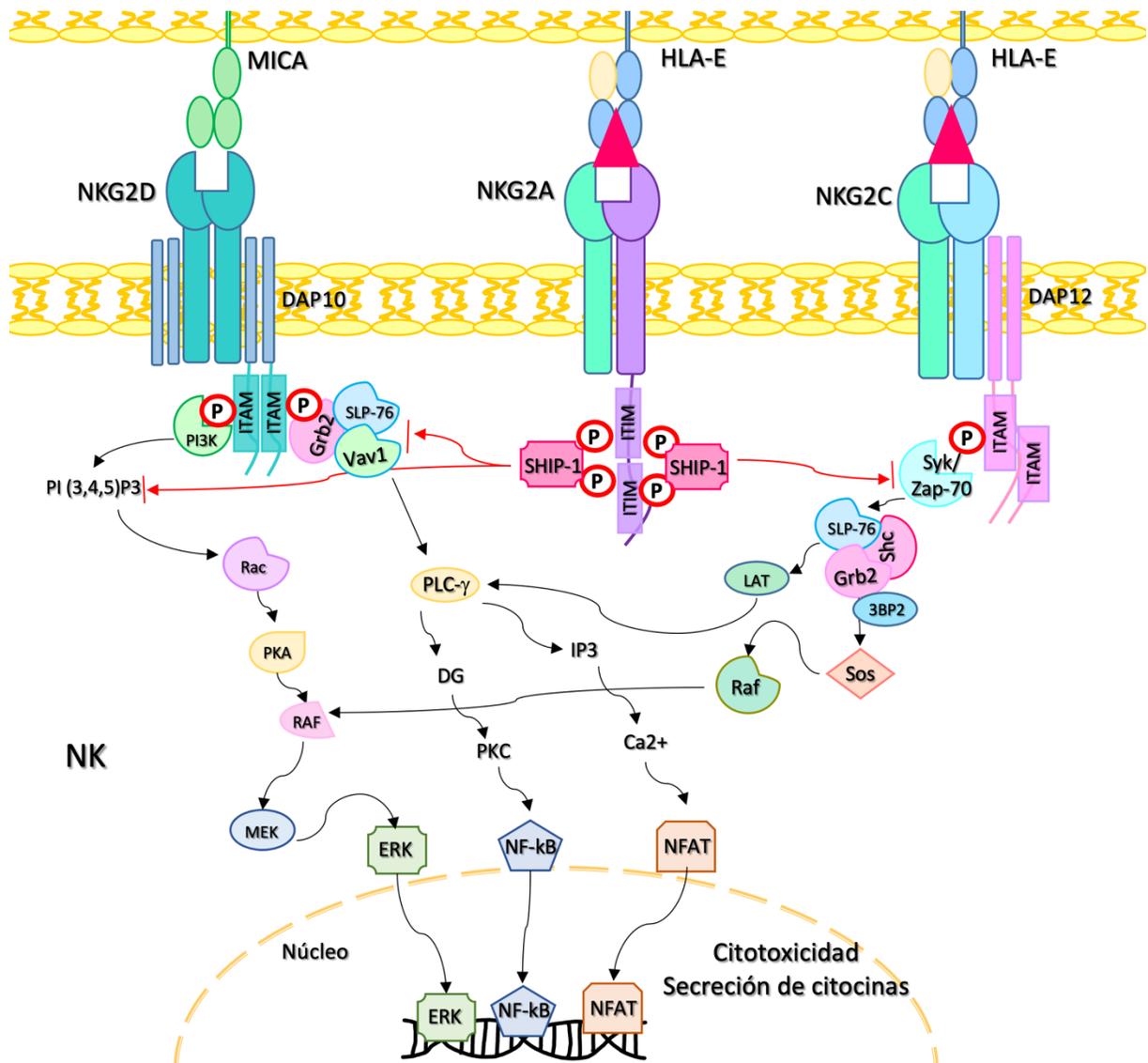


Figura 4. Vías de señalización de los receptores de la familia NKG2 en células NK.

Después de la interacción con sus respectivos ligandos los motivos ITIM del receptor NKG2A, se fosforilan y reclutan fosfatasa como SHP1 desencadenando la inhibición celular. Por otra parte, los receptores de activación NKG2D y NKG2C se asocian a moléculas adaptadoras (DAP10 y DAP12, respectivamente). Después de la interacción con sus respectivos ligandos, los motivos ITAM presentes en DAP10 y DAP12 se fosforilan y se inducen vías de señalización que desencadenan la producción de citocinas y la citotoxicidad hacia las células blanco.

1.7. NKG2D y TCPH

El TCPH es una inmunoterapia potencialmente curativa para el tratamiento de enfermedades hematológicas neoplásicas. El TCPH implica la infusión de células troncales y progenitoras hematopoyéticas para restablecer la función de la médula ósea y/o sistema inmunitario dañados o defectuosos en pacientes con leucemia de alto riesgo. Después del trasplante, la reconstitución del sistema inmunitario, así como el desarrollo y maduración de linfocitos citotóxicos, es un paso crucial para lograr la remisión. Dada su capacidad para erradicar selectivamente las células malignas, los linfocitos citotóxicos son mediadores esenciales en la EICL. Entre las poblaciones con capacidad citotóxica se encuentran las células NK y los linfocitos T CD8⁺. Las células NK son la primera población de linfocitos que se restablece en sangre periférica posterior al trasplante. De hecho, estas células pueden proveer protección antimicrobiana y EICL antes de la reconstitución de las células T. Los niveles altos de quimerismo en células NK en tiempos cortos postrasplante se asocian con bajos índices de recaída (1). Sin embargo, estas células también median una reacción inmunológica contra el tejido sano del receptor, que da como resultado el desarrollo de EICH. La EICH es una de las causas más frecuentes de muerte después de un TCPH (67). Por lo tanto, identificar los mecanismos involucrados en la EICH son esenciales para mejorar la sobrevida posterior al trasplante.

La EICH se origina durante el reconocimiento del tejido sano del paciente inmunocomprometido por los linfocitos citotóxicos alorreactivos (17). Dentro de los linfocitos citotóxicos involucrados en el desarrollo de EICH se incluyen a las células NK y las células T CD8⁺. Como se describió anteriormente, ambos tipos celulares expresan el receptor de activación NKG2D. Este receptor se une a los ligandos MICA, MICB y ULBPs, que se expresan en células bajo procesos de estrés celular, así como transformación oncogénica o infección viral (68).

Estudios previos han evidenciado que la interacción de NKG2D y sus ligandos tiene una participación esencial en la respuesta inmune durante la EICH. Primero, los ligandos del receptor NKG2D se expresan ampliamente en fibroblastos y células epiteliales (69), lo que correlaciona con el daño tisular observado en la EICH (27). En segundo lugar, el

régimen de acondicionamiento pretrasplante (radiación ionizante y/o quimioterapia) puede ser una señal de estrés, que induce la regulación positiva de los ligandos del receptor NKG2D (70,71). De hecho, los ligandos NKG2D se expresan ampliamente en biopsias de tejido de pacientes con EICH aguda (70,72). En tercer lugar, el receptor activador NKG2D se sobreexpresa después del trasplante (73,74). Finalmente, el bloqueo de la interacción del receptor NKG2D y sus ligandos inhibe el desarrollo de la EICH (75). Estos datos sugieren que la vía del receptor NKG2D y sus ligandos podrían estar involucrados en el daño tisular durante la EICH; por ello, los mecanismos involucrados en la expresión del receptor NKG2D podrían estar relacionados con el desarrollo de EICH.

La expresión del receptor NKG2D se ha asociado a los siguientes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs): rs1049174 (en el gen *KLRK1*, que codifica para NKG2D), rs2255336 (en el gen *KLRK1*, que codifica para NKG2D), rs2617160 (en la región intergénica *KLRC4-KLRK1*, que codifica para NKG2F-NKG2D), rs2246809 (dentro de la región intergénica *KLRC4-KLRK1*, que codifica para NKG2F-NKG2D), rs2617170 y rs2617171 (en el gen *KLRC4*, que codifica para NKG2F), así como rs1983526 (dentro de la región promotora del gen *KLRC1*, que codifica para el receptor NKG2A) (76,77) (Figura 5). Estos SNPs se encuentran en el brazo corto del cromosoma 12 en la región p13 dentro de una región de aproximadamente 2.5 Mb conocida como el complejo NK. Dentro del complejo NK, se codifican los receptores de la familia NKG2 (45,46,78). Los SNPs mencionados anteriormente están en desequilibrio de ligamiento y generan dos bloques de haplotipos; el bloque de haplotipo 1 (hb-1) está construido por rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171 y rs1983526, mientras que el bloque de haplotipo 2 (hb-2) es generado por rs2255336 y rs2246809. Cada uno de los bloques pueden subclasificarse en otros dos haplotipos, que se vinculan con el contenido de alelos y su asociación con la actividad citotóxica de células NK. Con respecto al bloque hb-1, el haplotipo CTCCC esta asociado a baja actividad citotóxica, mientras que el haplotipo GATGG se relaciona con alta actividad citotóxica. Por otra parte, en el bloque hb-2 se encuentra el haplotipo GG asociado a alta actividad citotóxica, mientras que el haplotipo AA se asocia a baja actividad citotóxica (77). Además de que los haplotipos mencionados anteriormente se asocian con la actividad citotóxica de los linfocitos, también se asocian

con la expresión del receptor NKG2D en las células NK y T CD8⁺ (79). Con base a la evidencia que respalda que estos SNP son importantes para la expresión del receptor NKG2D y a la actividad citotóxica de NK, también estos SNPs podrían tener una participación esencial en el desarrollo de la EICH.

En consecuencia, el objetivo del estudio fue analizar la participación de estos SNP y sus haplotipos en el desarrollo de EICH después del TCPH alogénico de donador relacionado. Debido a la correlación directa entre EICH y EICL, es probable que estos SNPs también estén asociados al EICL postrasplante.

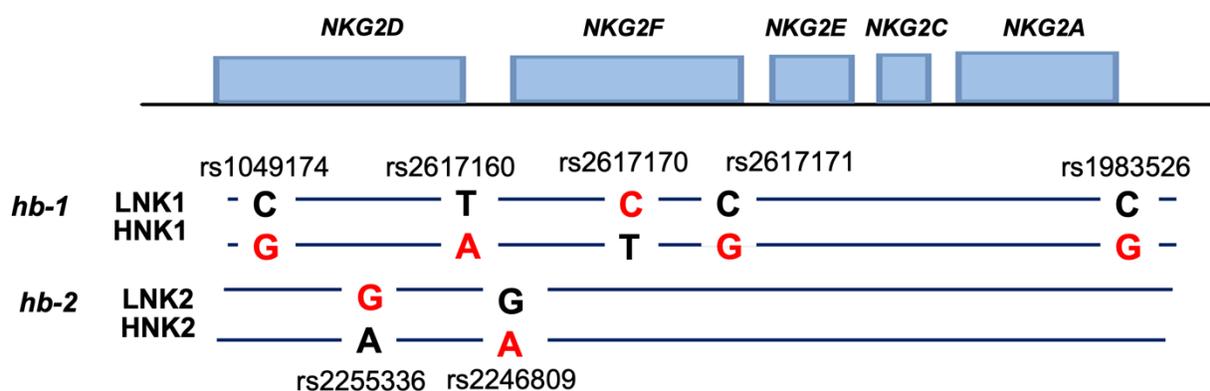


Figura 5. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la región génica que codifica para la expresión de la familia de receptores NKG2.

Los rs1049174 y rs2255336 se encuentran dentro del *KLRK1* que codifica para el receptor NKG2D, rs2617160 y rs2246809 se encuentran dentro la región intergénica *KLRC4-KLRK1* que codifican para los receptores NKG2F-NKG2D, el rs2617171 dentro del gen *KLRC4* que codifica para NKG2F y rs1983526 dentro de la región promotora del gen *KLRC1* que codifica para el receptor NKG2A. Estos SNPs presentan desequilibrio de ligamiento formando dos bloques de haplotipos hb-1 y hb2, cada uno de los cuales forma dos haplotipos dependiendo de la combinación de alelos asociados.

2. Justificación

La enfermedad injerto contra hospedero es una de las principales complicaciones posterior al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. La EICH es una enfermedad originada por el reconocimiento y desarrollo de la respuesta inmune de células provenientes del donador contra antígenos presentes en el tejido del receptor. Dentro de las células que participan en la respuesta inmunológica característica de la EICH se encuentran los linfocitos T CD8⁺ y las células NK, a través de la secreción de citocinas que favorecen el microambiente proinflamatorio durante el desarrollo de la enfermedad, así como la citotoxicidad directa hacia tejido del receptor. La citotoxicidad de las células NK y de las T CD8⁺ se asocia con la presencia de siete polimorfismos de un solo nucleótido rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171 y rs1983526 que se encuentran dentro del complejo NK donde se codifican los receptores de la familia NKG2.

Dado que estos polimorfismos se asocian a la función de células NK, así como T CD8⁺ y ambos tipos celulares presentan funciones esenciales en el desarrollo de EICH, el objetivo del estudio fue analizar la participación de estos SNP y sus respectivos haplotipos en el desarrollo de EICH posterior al TCPH alogénico de donador relacionado.

3. Hipótesis

Los haplotipos de la familia de receptores NKG2 se asocian al desarrollo de enfermedad injerto contra hospedero posterior al trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas, así como la función citotóxica de las células NK y CD8+.

4. Objetivo

Evaluar si los haplotipos de la familia de receptores NKG2 se asocian al desarrollo de la enfermedad injerto contra hospedero posterior al trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas, así como la función citotóxica de las células NK y CD8+.

4.1. Objetivos particulares

- 4.1.1. Estimar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNPs de la familia de receptores NKG2 en población mexicana (sujetos sanos).
- 4.1.2. Estimar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNPs de la familia de receptores NKG2 en pacientes con trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas.
- 4.1.3. Estimar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNPs de la familia de receptores NKG2 en donadores de trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas.
- 4.1.4. Determinar si los alelos, genotipos y/o haplotipos de la familia de receptores NKG2 se asocian con el desarrollo de la enfermedad injerto contra hospedero posterior al trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas.
- 4.1.5. Analizar si los haplotipos de NKG2 se asocian con la función citotóxica de células NK en sujetos clínicamente sanos.
- 4.1.6. Determinar la expresión génica relativa del receptor NKG2D en pacientes con trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (pacientes con y sin enfermedad injerto contra hospedero).
- 4.1.7. Analizar la función citotóxica en células NK de pacientes con trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (con y sin enfermedad injerto contra hospedero) y sus respectivos donadores.
- 4.1.8. Determinar si los haplotipos se asocian a la expresión del receptor NKG2D tanto en células NK como CD8+, y a la función citotóxica de células NK en pacientes posterior al TCPH.

5. Material y métodos

5.1. Diseño del estudio

Este estudio tiene como objetivo investigar si los SNPs y haplotipos de los receptores NKG2 están asociados con el desarrollo de EICH, la recaída y la sobrevida de los pacientes posterior al TCPH alogénico. Por lo anterior, se analizó una cohorte de pacientes tratados con trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas. Los pacientes incluidos fueron de la Unidad de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la Ciudad de México. Además de los pacientes, se incluyeron las muestras de sus respectivos donadores. Todos los participantes, pacientes y donadores, fueron informados de la naturaleza del estudio y asintieron firmando una carta de consentimiento informado para la donación voluntaria y anónima de muestras biológicas y la publicación de los datos resultantes de esta investigación. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del IMSS con número de registro R-2015-785-087 y se llevó a cabo de acuerdo a los principios establecidos en la declaración de Helsinki.

5.2. Población de estudio

Con el propósito de estimar las frecuencias de los SNPs y haplotipos en población mexicana se analizó una cohorte de 927 individuos clínicamente sanos y no relacionados. Los individuos fueron seleccionados a partir de una población general de donadores del banco central de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la Ciudad de México. Todos los sujetos fueron originarios de la Ciudad de México por al menos tres generaciones (mestizos mexicanos), mayores de 30 años de edad sin ningún síntoma de enfermedades autoinmunes, genéticas y/o cáncer, y sin medicaciones ni tratamiento de antibióticos. 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.

Por otra parte, para determinar las frecuencias de los SNPs y haplotipos mencionados anteriormente en pacientes se evaluó una cohorte formada por 131 sujetos con sus respectivos donadores, quienes fueron tratados con TCPH alogénico de 2014 a 2019 debido a enfermedades hematológicas de alto riesgo. Dentro de los desordenes hematológicos de los pacientes de esta cohorte se incluyen leucemias linfocítica aguda y mielocítica aguda (LLA y LMA, respectivamente) tanto en primera como en segunda remisión completa, síndrome mieloproliferativo, leucemia mielocítica crónica en fase aguda, leucemia bifenotípica, linfoma non-Hodgkin y leucemia linfocítica crónica. Pretrasplante, todos los pacientes recibieron uno de los siguientes esquemas de acondicionamiento acorde a su enfermedad: a) régimen mieloablativo que consistió de 16 mg/kg de busulfan oral (cuatro dosis administradas en los días -7 a -4) y 120 mg/kg de ciclofosfamida intravenosa (iv.) (dos dosis administradas en los días -3 y -2) con o sin 800 mg/m² de etoposido iv., b) este régimen también mieloablativo consistió de 12 Grays de radiación corporal total fraccionada (dos dosis administradas diariamente en los días -6 a -4, para completar 6 dosis) y 120 mg/kg de ciclofosfamida iv. (dos dosis administradas en los días -3 y -2), y c) este régimen de intensidad reducida consistió de 16 mg/kg de busulfan oral (cuatro dosis administradas en los días -7 a -4) y 30 mg/m² de fludarabina (cinco dosis administradas en los días -6 a -2) (80–82). En el día 0, todos los pacientes recibieron un injerto de sangre periférica movilizada con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés *granulocyte colony-stimulation factor*) proveniente de donadores relacionados (hermanos) HLA compatibles 10/10 (compatibilidad analizada para los *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-Cw, HLA-DR, and HLA-DQ). Postrasplante, todos los pacientes recibieron terapia profiláctica para la EICH que consistió de una dosis inicial de 15 mg/m² y dosis subsecuentes de 10 mg/m² de metotrexate (para los pacientes con LLA se administraron tres dosis en los días +1, +3 y +6, mientras para pacientes con LMA y las otras malignidades hematológicas incluidas en este estudio se administraron cuatro dosis en los días +1, +3, +6 y +11). Además, los pacientes recibieron 3 mg/kg de ciclosporina A oral o iv. ajustando a niveles sanguíneos de 200 a 400 ng/ml. La administración de ciclosporina A fue reducida gradualmente de los días +100 a +180 hasta suspender su administración. Por otra parte, los pacientes

también recibieron tratamiento profiláctico para infecciones que incluyó 200 mg de fluconazol oral diariamente para la prevención de infecciones fúngicas, 500 mg/m² de aciclovir oral diariamente para la prevención de infecciones virales, y 320/1600 mg de sulfametoxazol/trimetoprim (dos dosis administradas semanalmente), así como otros antibióticos en caso necesario para la prevención de infecciones bacterianas. Adicionalmente, todos los pacientes recibieron 100 U/kg de heparina i.v. (dos dosis administradas en los días -7 y +28) para la prevención de la enfermedad venooclusiva y 0.5 g/kg de inmunoglobulina G (dos dosis administradas en los días -8 y +14) para la prevención de infecciones.

La EICH aguda y crónica fueron diagnosticadas y categorizadas en grados de severidad de acuerdo a Consensus Grading Scale (83) y a los criterios contemporáneos del National Institute of Health Consensus (23).

La recaída postrasplante fue diagnosticada por criterios hematológicos para todas las enfermedades. En el 10% de los pacientes con recaída se administró esquemas paliativos a decisión del paciente, mientras que el 90% de los pacientes fueron tratados con esquemas para inducción a remisión buscando preparar al paciente para un segundo trasplante. En este contexto, los pacientes con recaída hematológica fueron considerados dentro del grupo de recaída a pesar de ser candidatos a un segundo trasplante. Por otra parte, en los pacientes con enfermedad mínima residual (EMR) positiva posterior al trasplante se programó la suspensión del tratamiento inmunosupresor buscando la aparición de EICH y con ello inducir la EMR negativa.

La ILD se realizó en 26 de los pacientes incluidos en este estudio a 5 meses postrasplante (rango de 1 a 12 meses). En todos los pacientes en los que administró la ILD se realizó con objetivo de negativizar la EMR. La ILD se administró a dosis escalonadas por incrementos de 3.5×10^6 células CD3⁺ a intervalos de tiempo de 8 semanas si no había evidencia de quimerismo total en el paciente (>95% de las células del donador) o manifestaciones clínicas de EICH aguda. Debido a la administración de ILD, 17 pacientes desarrollaron EICH aguda (65.4%) y el desarrollo de esta enfermedad se presentó a dentro del primer mes posterior a la ILD (rango de 1 a 4 meses).

5.3. Recolección de muestras de sangre

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de pacientes y donadores a diferentes tiempos de estudio. En los donadores las muestras de sangre se obtuvieron antes del trasplante, justo antes de la administración de G-CSF. En los pacientes también las muestras fueron colectadas pretrasplante, antes de la administración del régimen de acondicionamiento. Posterior al trasplante la recolección fue en los días +30, +70, +140, así como al momento de ser diagnosticados con EICH aguda, crónica y/o recaída hematológica.

5.4. Extracción del DNA

La extracción del DNA se realizó por microtécnica de *salting-out* (84). Brevemente, cada muestra fue tratada con 500 μ l de una solución de lisis de glóbulos rojos que contiene sucrosa 0.3 M, Tris-HCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM y Triton 100X al 1% y fue agitada vigorosamente por 5 minutos. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos y decantada el sobrenadante. La siguiente fase del proceso incluyó la lisis de leucocitos con 600 μ l de buffer pH 8 (NaCl 0.075 M y Na-EDTA 0.024 M), 150 μ l de SDS al 20% y 800 μ l $NaClO_4$ 5 M, la muestra fue agitada vigorosamente por 5 minutos y se agregaron 300 μ l de una solución de NaCl 5 M para separar el DNA de las proteínas. Después del periodo de agitación, la muestra fue centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue recolectado en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Al tubo con el sobrenadante se le adicionó 700 μ l de isopropanol a -20 °C para precipitar el DNA. El pellet obtenido se lavó con una solución de etanol frío al 70%, para finalmente resuspenderlo en agua inyectable. Posteriormente, la concentración y pureza del DNA obtenido se analizó mediante espectrofotometría a 280 y 260 nm. Finalmente, la integridad del DNA se estudió mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

5.5. Genotipificación

La discriminación alélica de los rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, y rs1983526 se realizó mediante PCR en tiempo real usando la plataforma Allelic Discrimination TaqMan Assays de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La genotipificación se llevo a acabo siguiendo las instrucciones del fabricante con los siguientes ensayos disponibles: C_9345347-10 (rs1049174), C_22274447-10 (rs2255336), C_1841959-10 (rs2617160), C_1842497-10 (rs2246809), C_1842316-10 (rs2617170), C_26984346-10 (rs2617171) y C_11919464-10 (rs1983526). Brevemente, 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, así como anillamiento y elongación por 1min a 60°C. La reacción concluyó con un ciclo final de amplificación a 60°C por 30 segundos. Los resultados de genotipificación fueron analizados mediante el software de StepOne v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Como controles de genotipificación se emplearon muestras previamente secuenciadas para cada genotipo.

5.6. Secuenciación

Para la secuenciación se emplearon muestras de genotipos homocigotos usando iniciadores específicos para cada SNP. La PCR se llevó a cabo a un volumen final de 25 µl que contienen 125 ng de DNA genómico, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 pmol de cada iniciador (IDT; San Jose, California, USA), 1mM de dNTPs, buffer para PCR 1X y 0.1 U de DNA polimerasa Platinum™ (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). La secuencia de los iniciadores de la hebra líder y rezagada usados para la secuenciación de los fragmentos donde se encuentran cada uno de los SNPs son listados en la Tabla 1. La PCR se llevó a cabo en el termociclador Veriti Thermal Cycler de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min seguida por 33 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineación/elongación a 59°C por 30 s (a 61°C para el rs1983526) y extensión a 72°C por 30 s, y finalmente un ciclo de elongación a 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit comercial ExoSAP-

IT™ PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez purificados, los productos de PCR fueron secuenciados usando el kit comercial BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y analizadas con el secuenciador Applied Biosystems 3730×L DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA).

5.7. Extracción de RNA

El RNA total se obtuvo a partir de células mononucleares de sangre periférica. Brevemente, a partir de 15 ml de sangre periférica de pacientes o de donadores se obtuvieron células mononucleares a través de centrifugación por gradiente de densidad usando Lymphoprep™ (Axis-Shield, Rodeløkka, Oslo, Norway). Las células mononucleares fueron lavadas con solución salina estéril y centrifugadas a 1,200 RPM por 15 minutos. Adicionalmente, se dieron dos lavados más a 900 RPM por 10 minutos con el fin de eliminar todos los restos de Lymphoprep™ y plaquetas que pudieran encontrarse en la muestra. Después de los tres lavados, se agregó 1ml de trizol (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) al botón de células mononucleares, se agitó en vórtex por 5min y se incubó a 4°C por 5 min. Al finalizar la incubación, se adicionaron 200 µl cloroformo (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) a la muestra, se agitó en vórtex por 5min, se incubó a 4°C por 5 min y se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 15 min. La fase acuosa (700 µl) se transfirió a un tubo eppendorf y se adicionó 700 µl de isopropanol (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) a 4°C antes de dejar incubando por 24 h a -20°C. Posterior a la incubación, la muestra fue descongelada y centrifugada a 12000 rpm a 4°C durante 30 min para obtener RNA. Posterior a la extracción, la concentración y pureza del RNA fueron determinadas por espectrofotometría a 260 y 280 nm, mientras que la integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

5.8. Síntesis de cDNA

El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado mediante la técnica de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) a partir del RNA total siguiendo las

especificaciones del kit comercial *SuperScript™ II Reverse Transcriptase System*, (Invitrogene, California, USA). Brevemente, se preparó una mezcla de reacción con 1 µg de RNA total, 1 µl de oligo(dT)₂₀ (50 µM), 1 µl de dNTP mix (10mM) y 7µl de agua DEPC. La mezcla de reacción se incubó a 65°C por 5 min y posteriormente a 4°C por un minuto. La siguiente parte de la reacción incluyó la adición de 2 µl de buffer RT (10X), 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de DTT (0.1 mM), 1µl de RNAasa OUT (40 U/µl) y 1µl SuperScript III RT (200 U/µl). Posteriormente, un ciclo de amplificación a 50°C por 50min, seguido por un ciclo a 85°C durante 5 min y un ciclo a 4°C durante un minuto. La parte final de la reacción incluyó la adición de 1 µl de RNAasa H (2 U/µl) e incubar a 37°C durante 20 minutos. El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

5.9. Expresión génica relativa del receptor NKG2D

La expresión de NKG2D se realizó mediante PCR en tiempo real usando la plataforma de TaqMan Assays Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La expresión génica relativa se llevo a acabo siguiendo las instrucciones del fabricante con los siguientes ensayos disponibles C_9345358-10 (NKG2D) y C_22274459-10 (GAPDH). Para determinar la expresión genica relativa de NKG2D se emplearon los iniciadores 5'-GGACAGTGGGCAGAAGATGT y 3'-TTCATGGATCTCACAGACCCT, así como la sonda FAM-ATGCAAGCCTTCTTTCTG, mientras que para GAPDH se emplearon los iniciadores 5'-GGCGCCTGGTCACCA y 3'-GGTGCCATGGAATTTGCC, así como la sonda FAM-CATGGTTTACATGTTCCAATATG. Las condiciones de reacción incluyeron 1 µl de 20X TaqMan Gene Expression Assay, 10 µl de 2X TaqMan Gene Expression Master Mix, 4 µl de cDNA a 50 ng y 5 µl de agua libre de RNAasas. 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, así como anillamiento y elongación por 1min a 60°C. La reacción concluyó con un ciclo final de amplificación a 60°C por 30 segundos. El ensayo de expresión genica se realizó usando como control endógeno GAPDH y los niveles de expresión de los donadores como calibradores. La expresión génica relativa de NKG2D se calculó con el método

comparativo del CT usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ de la muestra de interés - ΔCT del calibrador y $\Delta CT = CT$ del gen de interés - CT del gen endógeno.

5.10. Aislamiento de células NK

Las células NK se enriquecieron mediante selección inmunomagnética negativa a partir de células mononucleares de sangre periférica siguiendo las especificaciones del *kit* comercial NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Brevemente, cada 10 millones de células mononucleares fueron resuspendidas en 40 μ l de buffer, se adicionaron 10 μ l del cocktail de anticuerpos y la muestra fue incubada por 5 minutos a 4°C. Después del periodo de incubación, se adicionaron 30 μ l de buffer adicionales, 20 μ l del cocktail de microperlas y la muestra se incubó durante 10 minutos adicionales a 4°C. Finalmente, la muestra fue pasada por una columna para la separación magnética. La pureza del enriquecimiento en las células NK se evaluó como el % de células CD56⁺ posterior al enriquecimiento.

5.11. Determinación de la capacidad citotóxica de células NK

Para identificar células blanco, en este ensayo 0.5×10^6 células de la línea de celular de leucemia mieloide crónica K562 (ATCC CCL-243) (ATCC, Gaithersburg, MA, USA) se teñieron con 50 μ l de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Biolegend, San Diego, CA, USA) durante 15 minutos a 37°C. Una vez teñidas, las células blanco se co-cultivaron con células NK enriquecidas 10:1 (10 células NK por cada célula K562) por 4 h a 37°C. Al terminar el tiempo de incubación, las células del co-cultivo se lavaron con 1 ml de PBS al 1% y posteriormente se incubaron por 15 min a temperatura ambiente con 50 μ l de Zombie Violet Fixable Viability Kit (Biolegend, San Diego, CA, USA) a una dilución 1/1000. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y se teñieron con el anticuerpo CD56. Finalmente, las muestras del co-cultivo fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la actividad citotóxica de las células NK. Por consiguiente, la actividad citotóxica se determinó por el porcentaje de células blanco muertas CFSE⁺Zombie⁺ a causa del efecto de las células NK.

5.12. Citometría de flujo

Para analizar los niveles de expresión de los marcadores de interés se emplearon diferentes anticuerpos para su determinación por citometría de flujo. Brevemente, una suspensión de 1×10^6 células mononucleares de sangre periférica en PBS 1X se incubaron con 5 μ l del anticuerpo monoclonal específico para cada molécula por 20 minutos a 4 °C. Se emplearon los siguientes anticuerpos anti-human CD4 PerCP (clona OKT4), anti-human CD19 PerCP (clona HIB19), anti-human CD14 PerCP (clona HCD14), anti-human CD16 FITC (clona 3G8), anti-human CD56 PE (clona 5.1H11), anti-human CD134 NKG2D APC (clona 1D11), CD3 anti-human Brilliant Violet510 (clona SK7), y CD8a anti-human APC-Cy7 (clona HIT8a) (Biolegend, San Diego, CA, USA). Posteriormente, las células se lavaron con 500 μ l de PBS 1X para retirar el exceso de anticuerpo. Finalmente, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se adquirieron en el citómetro de flujo MACSQuant® Analyzer 10 Flow Cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

5.13. Análisis estadístico

Las frecuencias de alelos, genotipos y haplotipos en pacientes con EICH se compararon con las de los pacientes sin EICH. Las frecuencias de alelos y genotipos se estimaron con el paquete estadístico SPSS software versión 22.0 (IBM, Chicago, IL, EE. UU.), mientras que las frecuencias de haplotipos se estimaron con el software Haploview versión 4.0 (85). Se empleó la prueba de chi-cuadrada para probar las diferencias entre los grupos con el software SPSS o Haploview. Los resultados con valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos y se utilizaron razones de probabilidad (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95 % para evaluar la importancia de todas las asociaciones. Las frecuencias genotípicas no se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg en ningún caso ($p > 0.05$). Las asociaciones de genotipos con desarrollo de EICH se analizaron mediante regresión logística bajo los siguientes modelos de inherencia: codominante 1 (alelo mayor homocigotos versus heterocigotos), codominante 2 (alelo mayor homocigotos versus alelo menor homocigotos), dominante (alelo mayor homocigotos versus

heterocigotos + alelo menor alelo homocigoto), recesivo (alelo mayor homocigoto + heterocigoto versus alelo menor homocigoto), sobredominante (heterocigoto versus alelo mayor homocigoto + alelo menor homocigoto) y aditivo (alelo mayor homocigoto versus heterocigoto versus alelo menor homocigoto). El análisis de desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés *linkage disequilibrium*) se realizó mediante el software Haploview, mientras que la generación de haplotipos se consideró cuando $r^2 \geq 0.80$. Las variables continuas y categóricas se estudiaron mediante las pruebas de U de Mann-Whitney o Chi-cuadrada. Finalmente, se calcularon medianas y rangos intercuartílicos (IQR, por sus siglas en inglés *Interquartile range*) para describir las edades de todos los individuos incluidos en el presente estudio.

6. Resultados

6.1. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 en población mexicana.

Con el objetivo de determinar la frecuencia alélica, genotípica y haplotípica de los SNPs de la familia de receptores NKG2 en población mexicana, se realizó la genotipificación de los rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171 y rs1983526 en 928 individuos mexicanos clínicamente sanos. Como se mencionó en la sección de material y métodos 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. La cohorte de individuos se conformó de 53.8% de mujeres (499/928) y 46.2% de hombres (429/928) con una mediana de edad de 36 años (IQR 29-45 años). Para verificar los resultados de la genotipificación, el 10% de las muestras fueron secuenciadas empleando los iniciadores cuyas secuencias se detallan en la Tabla 1, obteniendo una concordancia del 100% entre los alelos detectados por secuenciación y los alelos detectados por genotipificación mediante PCR en tiempo real.

El análisis de las frecuencias alélicas en nuestra población de estudio mostró que los alelos más frecuentes fueron: C del rs1049174, G del rs2255336, T del rs2617160, G del rs2246809, C del rs2617170, G del rs2617171 y G del rs1983526 con frecuencias de 0.628, 0.929, 0.634, 0.930, 0.627, 0.623 y 0.505, respectivamente (Tabla 2). El resultado de las frecuencias genotípicas indicó que los genotipos más comunes fueron: CG del rs1049174, GG del rs2255336, AT del rs2617160, GG del rs2246809, CT del rs2617170, CG del rs2617171 y CG del rs1983526 con frecuencias de 0.476, 0.863, 0.485, 0.865, 0.494, 0.494 y 0.510, respectivamente (Tabla 2).

La distribución de las frecuencias alélicas de nuestra población se comparó con otras poblaciones por compartir componentes de ancestría con algunas de ellas. Las poblaciones fueron Los Angeles California con ancestría mexicana, Europa, África y el Sur de Asia, de acuerdo a lo reportado en la base de datos del NCBI (86), mientras que la frecuencia de estos poliformismos fue obtenida de Hayashi, et al (77). Los alelos C del

rs1049174, T del rs2617160, C del rs2617170 y G del rs2617171 fueron menos frecuentes en nuestra población que en población de Los Ángeles California con ancestría mexicana ($p < 0.05$), mientras que la frecuencia de los alelos G del rs2255336, G del rs2246809 y G del rs1983526 fue similar entre ambas poblaciones (Tabla 3). Por otra parte, los alelos C del rs1049174, G del rs2255336, T del rs2617160, G del rs2246809, C del rs2617170 y G del rs2617171 fueron más frecuentes en nuestra población que en población de África ($p < 0.05$), mientras que sólo el alelo G del rs1983526 resultó ser más frecuente en la población mencionada anteriormente ($p < 0.05$) (Tabla 3). Además, los alelos C del rs1049174, T del rs2617160, G del rs2617171 y G del rs1983526 fueron menos frecuentes en nuestra población que en la europea ($p < 0.05$), en cambio los alelos G de los rs2255336 y rs2246809 fueron más frecuentes en nuestra población que en la europea ($p < 0.05$) y la frecuencia del alelo C del rs2617170 fue similar entre ambas poblaciones (Tabla 3). Por otra parte, los alelos C del rs1049174, T del rs2617160, G del rs2246809, C del rs2617170 y G del rs2617171 fueron menos frecuentes en nuestra población que en la población Sur de Asia ($p < 0.05$), el alelo G del rs1983526 fue más común en la población de Asia ($p < 0.05$) y la frecuencia del alelo G del rs2255336 fue similar entre ambas poblaciones (Tabla 3). Finalmente, la frecuencia de los alelos C del rs1049174, G del rs2255336, T del rs2617160, G del rs2246809, C del rs2617170 y G del rs2617171 fue mayor en nuestra población que en población japonesa ($p < 0.05$), mientras que el alelo G del rs1983526 fue más frecuente en la población japonesa ($p < 0.05$) (Tabla 3). Además, se realizó una comparación de la distribución de las frecuencias genotípicas de los SNPs estudiados entre la población mexicana y las poblaciones mencionadas anteriormente, encontrando diferencias significativas que pueden observarse a detalle en la Tabla 3.

Considerando que los SNP en estudio muestran desequilibrio de ligamiento (77), se determinó las frecuencias de los haplotipos. En población mexicana se observaron dos bloques de haplotipos. El primero formado por los rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171 ($r^2 \leq 0.89$), mientras que el segundo haplotipo se formó por los rs2255336 y rs2246809 ($r^2 = 0.78$) (hb-2). En contraste, el rs1983526 no presentó desequilibrio de ligamiento con ninguno de los SNPs (Figura 5). El bloque de SNPs rs1049174,

rs2617160, rs2617170 y rs2617171 fue denominado variante del haplotipo del bloque 1 (hb-1v) por no presentar desequilibrio de ligamiento con rs1983526. Al subclasificarse los haplotipos hb-1v y hb-2 con base en sus alelos se generaron dos haplotipos por cada uno. El haplotipo hb-1v presentó los alelos CTCG, mientras que el otro fue GATC. Por otra parte, el bloque generado por los rs2255336 y rs2246809 (hb-2) formó el haplotipo con los alelos GG, mientras que el segundo con los alelos AA (Figura 5).

Además, se determinó la frecuencia con la que estos haplotipos se presentan en población mexicana. En lo que corresponde al primer bloque, haplotipo CTCG presentó una frecuencia de 0.610, mientras que el haplotipo GATC fue una frecuencia de 0.356 (Tabla 4). En el segundo bloque, el haplotipo GG su frecuencia fue 0.991, mientras que el haplotipo AA tuvo una frecuencia de 0.006 (datos no mostrados).

Tabla 1. Iniciadores para los ensayos de secuenciación

SNP	Posición en el Chr 12	Gen	Localización genética	Secuencia del primer (5'→3')	Tamaño del producto (bp)
rs1049174	10372766	<i>KLRK1</i>	Exón 8	F: CACAAGCCCAGAGTGGATGG R: TTGGGTGGAGGACCCATTA	236
rs2255336	10379727	<i>KLRK1</i>	Exón 4	F: TCTAGGGATGACTGGGGA R: TGTTGCAATCTACTTCTCTGTTGT	358
rs2617160	10392998	<i>KLRC4-KLRK1</i>	Intergénica	F: AGGAAGCTGTGCCAGAGAAAA R: GCATCTATGGCCACACCACC	326
rs2246809	10404445	<i>KLRC4-KLRK1</i>	Intergénica	F: TGGAATGATACATGTTTTCTCTGC R: ACAAACAGAAATCTGAGTAACCTCT	405
rs2617170	10408358	<i>KLRC4</i>	Intrón 2	F: TTGGAAGCGCCTTGAAACATT	689
rs2617171	10408680	<i>KLRC4</i>	Exón 3	R: AAAGGACATGCCCTCATATAATCT	
rs1983526	10455414	<i>KLRC1</i>	-729 bp	F: ACAGACCTTGAAGTGGACCC R: CATGATCCTTTTACTAGGGCTTCT	125

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido; Chr: cromosoma; F: secuencia del iniciador para hebra líder; R: secuencia del iniciador para hebra rezagada; bp: pares de bases.

Tabla 2. Frecuencias de alelos y genotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 en población Mexicana

SNP	Alelo	Frecuencias	
		alélicas (n) 2n=1856	Genotipo Frecuencias genotípicas (n) n=928
rs1049174	C	0.628 (1166)	CC 0.390 (362)
	G	0.372 (690)	CG 0.476 (442)
			GG 0.134 (124)
rs2255336	G	0.929 (1724)	GG 0.863 (801)
	A	0.071 (132)	AG 0.131(122)
			AA 0.005 (5)
rs2617160	T	0.634 (1176)	TT 0.391 (363)
	A	0.366 (680)	AT 0.485 (450)
			AA 0.124 (115)
rs2246809	G	0.930 (1727)	GG 0.865 (803)
	A	0.070 (129)	AG 0.130 (121)
			AA 0.004 (4)
rs2617170	C	0.627 (1164)	CC 0.380 (353)
	T	0.373 (692)	CT 0.494 (458)
			TT 0.126 (117)
rs2617171	G	0.623 (1156)	GG 0.376 (349)
	C	0.377 (700)	CG 0.494 (458)
			CC 0.130 (121)
rs1983526	G	0.505 (937)	GG 0.250 (232)
	C	0.495 (919)	CG 0.510 (473)
			CC 0.240 (223)

n: individuos; SNP: polimorfismo de un solo nucleótido; Chr: cromosoma.

Tabla 3. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 entre población mexicana, población de Los Angeles California con ancestría mexicana, africana, europea y asiática

SNP	Alelo ó genotipo	Ciudad de México n=928	Ancestría Mexicana ^a n=64	Población			
				Africa ^b n=661	Europa ^b n=503	Ásia del sur ^b n=489	Japón n=408
Frecuencia (n)							
rs1049174	C	0.628 (1166)	0.734 (94)*	0.246 (325)*	0.690 (694)*	0.553 (541)*	0.581 (474)*
	CC	0.390 (362)	0.562 (36)*	0.054 (36)*	0.501 (252)*	0.311 (152)*	0.348 (142)
	CG	0.476 (442)	0.344 (22)*	0.383 (253)*	0.378 (190)*	0.485 (237)	0.466 (190)
	GG	0.134 (124)	0.094 (6)	0.563 (372)*	0.121 (61)	0.204 (100)*	0.186 (76)*
rs2255336	G	0.929 (1724)	0.883 (113)	0.553 (731)*	0.817 (822)*	0.910 (890)	0.772 (630)*
	GG	0.863 (801)	0.781 (50)	0.315 (208)*	0.674 (339)*	0.830 (406)	0.603 (246)*
	AG	0.131 (122)	0.203 (13)	0.477 (315)*	0.286 (144)*	0.160 (78)	0.338 (138)*
	AA	0.005 (5)	0.016 (1)	0.209 (138)*	0.040 (20)*	0.010 (5)	0.059 (24)*
rs2617160	T	0.634 (1176)	0.734 (94)*	0.523 (692)*	0.689 (693)*	0.548 (536)*	0.569 (464)*
	TT	0.391 (363)	0.562 (36)*	0.272 (180)*	0.497 (250)*	0.303 (148)*	0.331 (135)*
	AT	0.485 (450)	0.344 (22)*	0.502 (332)	0.384 (193)*	0.491 (240)	0.475 (194)
	AA	0.124 (115)	0.094 (6)	0.225 (149)*	0.119 (60)	0.207 (101)*	0.194 (79)*
rs2246809	G	0.930 (1727)	0.891 (114)	0.737 (974)*	0.819 (824)*	0.908 (888)*	0.771 (629)*
	GG	0.865 (803)	0.797 (51)	0.551 (364)*	0.676 (340)*	0.826 (404)*	0.598 (244)*
	AG	0.130 (121)	0.188 (12)	0.372 (246)*	0.286 (144)*	0.164 (80)	0.346 (141)*
	AA	0.004 (4)	0.016 (1)	0.077 (51)*	0.038 (19)*	0.010 (5)	0.056 (23)*
rs2617170	C	0.627 (1164)	0.727 (93)*	0.433 (572)*	0.663 (667)	0.544 (532)*	0.562 (459)*
	CC	0.380 (353)	0.547 (35)*	0.174 (115)*	0.455 (229)*	0.303 (148)*	0.324 (132)*

	CT	0.494 (458)	0.359 (23)*	0.517 (342)	0.416 (209)*	0.483 (236)	0.478 (195)
	TT	0.126 (117)	0.094 (6)	0.309 (204)*	0.129 (65)	0.215 (105)*	0.198 (81)*
rs2617171	G	0.623 (1156)	0.719 (92)*	0.240 (317)*	0.663 (667)*	0.536 (524)*	0.436 (356)*
	GG	0.376 (349)	0.531 (34)*	0.067 (44)*	0.455 (229)*	0.294 (144)*	0.196 (80)*
	CG	0.494 (458)	0.375 (24)	0.346 (229)*	0.416 (209)*	0.483 (236)	0.480 (196)
	CC	0.130 (121)	0.094 (6)	0.587 (388)*	0.129 (65)	0.223 (109)*	0.324 (132)*
rs1983526	G	0.505 (937)	0.492 (63)	0.859 (1135)*	0.588 (592)*	0.597 (584)*	0.550 (449)*
	GG	0.250 (232)	0.250 (16)	0.735 (486)*	0.376 (189)*	0.362 (177)*	0.306 (125)*
	CG	0.510 (473)	0.484 (31)	0.247 (163)*	0.425 (214)*	0.470 (230)	0.488 (199)
	CC	0.240 (223)	0.266 (17)	0.018 (12)*	0.199 (100)	0.168 (82)*	0.206 (84)

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido; n: individuos.

^aPoblación nacida en los Angeles California USA con ancestría mexicana (86). ^bLas frecuencias en estas poblaciones fueron obtenidas de la base de datos de NCBI (86). ^cLa frecuencias esta población fueron obtenidas de Hayashi, et al (77).

Las comparaciones fueron realizadas usando las frecuencias alélicas y/o genotípicas en la población de la Ciudad de México como grupo de referencia, *p≤0.05.

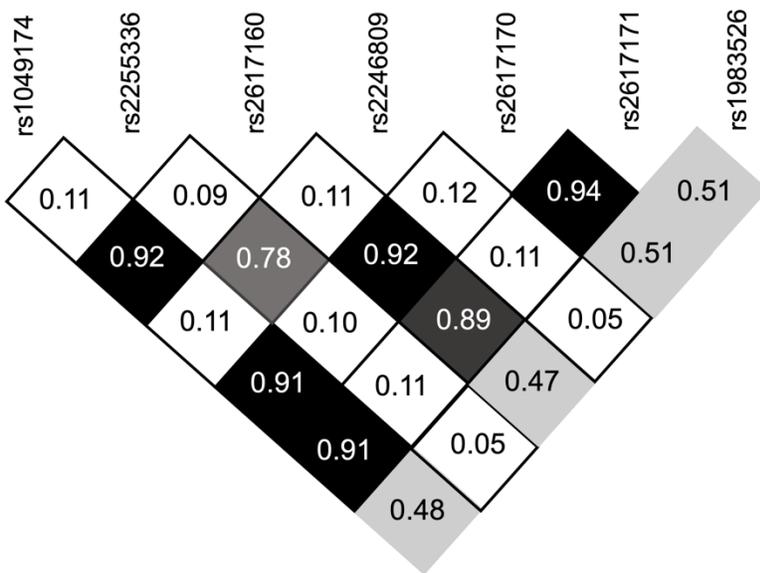


Figura 6. Identificación de la variante del haplotipo del bloque 1 (*hb-1v*).

Con los datos de genotipificación se realizó el análisis de desequilibrio de ligamiento usando el software Haploview 4.0. La generación de haplotipos fue considerada cuando el valor de $r^2 > 0.80$. En el plot de desequilibrio de ligamiento, los valores dentro de cada rombo corresponden a los valores de r^2 y el color de cada rombo depende de este valor. Los rombos de color negro indican que los SNPs que se encuentran en intersección presentan $r^2 > 0.80$, para los rombos en gris oscuro el valor r^2 es de < 0.80 a > 0.60 , en rombos de color gris los valores de r^2 son de < 0.60 a > 0.40 , los rombos en gris claro son para valores de r^2 de < 0.40 a > 0.20 y en blanco los valores de r^2 son < 0.20 .

Tabla 4. Frecuencia de la variante del haplotipo del bloque 1 (*hb-1v*)

Haplotipo ^a	Frecuencia (n) n=928
CTCG	0.610 (1132)
GATC	0.356 (661)
CTCG/CTCG	0.364 (338)
CTCG/GATC	0.460 (427)
GATC/GATC	0.114 (106)

n: individuos.

^aEl orden de los SNPs en los haplotipos es de acuerdo con su posición en el cromosoma 12 (C/G para el rs1049174, A/T para el rs2617160, C/T para el rs2617170 y C/G para el rs2617171).

6.2. *Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 en pacientes con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y respectivos sus donadores relacionados*

Posterior al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas las células NK tienen una función esencial en el restablecimiento del sistema inmune, así como evitar la recaída postrasplante. Esta función de las células NK ha sido asociada con la presencia de los rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, y rs1983526 localizados en los genes que codifican para la familia de receptores NKG2 (77). Por tanto, se realizó el estudio de una cohorte de 131 pacientes con TCPH alogénico de donador relacionado con el objetivo de determinar si estos polimorfismos están asociados al desarrollo de EICH, recaída o sobrevida en pacientes postrasplante.

Las características de la cohorte de pacientes se describen en la Tabla 5. Brevemente, el tiempo de seguimiento posterior al trasplante fue de 59 meses (IQR: 26-93 meses). Todos los pacientes incluidos en este se trasplantaron con donadores relacionados (hermanos), de los cuales el 95.4% fueron HLA compatibles con 10/10 (*loci* A, B, C, DR y DQ) y 57.3% fueron de donador hombre. La mediana de edad para los receptores fue de 34 años y de 33 años para los donadores (IQR: 24-43 años, en ambos casos). Los pacientes incluidos en nuestra corte de estudio tenían diagnósticos de enfermedades hematológicas de alto riesgo, los principales padecimientos para trasplantes fueron leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda (42.7% y 34.3%, respectivamente). Antes del TCPH, la mayoría de los pacientes recibieron un régimen de acondicionamiento mieloablatoivo (89.3%), no presentaron incompatibilidad ABO con sus respectivos donadores (66.4%) y no requirieron la infusión de linfocitos de donador (ILD) (80.1%). Finalmente, el 75.6% de los pacientes incluidos en nuestra cohorte de estudio desarrolló EICH, el 30.5% de los sujetos presentó recaída postrasplante y la sobrevida a 33 meses postrasplante fue de 49.6%.

Los pacientes también fueron categorizados por la presencia de EICH y aquellos que no presentaron la enfermedad (sin EICH), los cuales se consideraron como grupo sin EICH. Estas características se presentan en la Tabla 5. Variables como la compatibilidad HLA

entre receptor y donador, compatibilidad de género, edad receptor y donador, enfermedad hematológica de diagnóstico, régimen de acondicionamiento, incompatibilidad ABO e infusión de linfocitos de donador fueron similares entre el grupo de pacientes con EICH y el grupo sin EICH (Tabla 5). En contraste, variables como la recaída y la sobrevida posterior al trasplante fue claramente diferente entre ambos grupos. Por ello, la recaída fue menos frecuente en pacientes que desarrollaron EICH que en el grupo sin EICH (14.1% *versus* 81.3%, respectivamente) ($p < 0.0001$). Por otra parte, la sobrevida fue mayor en los pacientes con EICH que en el grupo sin EICH (56.6% *versus* 28.1%, respectivamente) ($p = 0.007$) (Tabla 5).

Tabla 5. Características clínicas de la población de estudio

Características	EICH	Sin EICH	<i>p</i> ^a
	n=99	n=32	
		n (porcentaje)	
Relación con los pacientes y compatibilidad HLA ^b			1.000
Hermanos (HLA compatibles 10/10)	94 (94.9)	31 (96.9)	
Compatibilidad de género (D/R)			0.526
Femenino/Femenino	18 (18.2)	9 (28.1)	
Femenino/Masculino	24 (24.2)	5 (15.6)	
Masculino/Femenino	22 (22.2)	8 (25.0)	
Masculino/Masculino	35 (35.4)	10 (31.3)	
Edad ^c			
Receptor (años)	33 (24–43)	35 (23–42)	0.991
Donador (años)	32 (24–43)	35 (24–43)	0.866
Diagnóstico			0.131
Leucemia linfoide aguda	39 (39.4)	17 (53.1)	
Leucemia mieloide aguda	35 (35.4)	10 (31.3)	
Síndrome mieloproliferativo	8 (8.1)	3 (9.4)	
Leucemia mieloide crónica	10 (10.1)	0 (0)	
Leucemia bifenotípica	5 (5.1)	2 (6.3)	
Linfoma non-Hodgkins	1 (1)	0 (0)	
Leucemia linfoide crónica	1 (1)	0 (0)	
Régimen de acondicionamiento			0.745
Mieloablativo	89 (89.9)	28 (87.5)	
Intensidad reducida	10 (10.1)	4 (12.5)	
Incompatibilidad ABO			0.452
Si	35 (35.4)	9 (28.1)	
No	64 (64.6)	23 (71.9)	
ILD			0.177
Si	17 (17.2)	9 (28.1)	
No	82 (82.8)	23 (71.2)	
EICH aguda			
Grado I	5 (12.2)		
Grado 2	16 (39.0)		
Grado 3	11 (26.8)		

Grado 4	9 (22.0)		
EICH crónica			
Limitada	11 (11.1)		
Extensiva	60 (60.6)		
Recaída			< 0.0001
Si	14 (14.1)	26 (81.3)	
No	85 (85.9)	6 (18.8)	
Sobrevida			0.007
Vivos	56 (56.6)	9 (28.1)	
Muertos	43 (43.4)	23 (71.9)	

n: número de individuos; EICH: enfermedad injerto contra hospedero; sin EICH: pacientes que no desarrollaron EICH posterior al TCPH alogénico; HLA: antígenos leucocitarios humanos; D: donador; R: receptor, ILD: infusión de linfocitos de donador.

^a El análisis de variables continuas se realizó mediante U de Mann-Whitney, mientras que el análisis de variables categoricas se realizó mediante Chi-squared.

^b La tipificación de HLA se realizó incluyendo HLA-A, -B, -C, -DRB1, y -DQB1.

^c Mediana (rango intercuartílicos), *p≤0.05.

Para determinar si la presencia de los rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, y rs1983526 se asocian con el desarrollo de EICH, se compararon las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas entre el grupo de pacientes que desarrollaron EICH y el grupo sin EICH. Con respecto a las frecuencias alélicas se puede observar en la Tabla 6 que los alelos G del rs1049174, A del rs2617160, T del rs2617170 y C del rs2617171 fueron más frecuentes en el grupo de pacientes con EICH que en el grupo sin EICH (0.44 *versus* 0.28, p=0.026; 0.42 *versus* 0.28, p=0.043; 0.43 *versus* 0.27, p=0.021; y 0.43 *versus* 0.27, p=0.018; respectivamente). En contraste, el alelo C del rs1983526 fue menos frecuente en los pacientes con EICH que en el grupo sin EICH (0.43 *versus* 0.59, respectivamente) (p=0.023). Por otra parte, la frecuencia de los alelos G de los rs2255336 y rs2246809 fue similar entre ambos grupos de estudio (0.43 *versus* 0.27, p=0.021; y 0.43 *versus* 0.27, p=0.018; respectivamente). Con base en lo anterior, los rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171 podrían ser de riesgo para el desarrollo de EICH en pacientes con TCPH

alogénico de donador relacionado, mientras que el rs1983526 podría ser de protección para el desarrollo de esta enfermedad.

Tabla 6. Asociación estadística de los alelos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 con el desarrollo de la EICH

SNP	Alelos	EICH (n= 198) n (frecuencia)	sin EICH (n= 64) n (frecuencia)	OR (IC 95%)	P
rs1049174	G	87 (0.44)	18 (0.28)	2.00 (1.09–3.70)	0.026*
rs2255336	G	182 (0.92)	58 (0.91)	1.18 (0.44–3.15)	0.746
rs2617160	A	84 (0.42)	18 (0.28)	1.89 (1.02–3.48)	0.043*
rs2246809	G	182 (0.92)	58 (0.91)	1.18 (0.44–3.15)	0.746
rs2617170	T	85 (0.43)	17 (0.27)	2.08 (1.12–3.87)	0.021*
rs2617171	C	86 (0.43)	17 (0.27)	2.12 (1.14–3.96)	0.018*
rs1983526	C	85 (0.43)	38 (0.59)	0.52 (0.29–0.91)	0.023*

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido; EICH: enfermedad injerto contra hospedero; n: número de individuos; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confianza.

Las comparaciones entre grupos se realizaron usando las frecuencias alélicas del grupo sin EICH como referencia (pacientes que no desarrollaron EICH posterior al TCPH alogénico), *p≤0.05.

Con respecto a la distribución de las frecuencias genóticas entre los pacientes con EICH y sin EICH (Control), estos datos se muestran en la Tabla 7. Los genotipos GG del rs1049174, TT del rs2617170 y CC del rs2617171 mostraron resultados significativos en el grupo con EICH que en el grupo sin EICH (0.21 *versus* 0.06, OR codominante 2= 5.09 y OR aditivo= 1.95; 0.21 *versus* 0.03, OR codominante de letra 2= 9.60, OR recesivo= 8.35 y OR aditivo= 2.01; 0.22 *versus* 0.03, OR codominante 2= 10.06, OR recesivo= 8.86 y OR aditivo= 2.03; respectivamente). En contraste, el genotipo CC del rs1983526 fue menos frecuente el pacientes con EICH que en el grupo sin EICH (0.22 *versus* 0.34, OR codominante 2= 0.28, OR dominante= 0.32 y OR aditivo= 0.55. Por otra parte, la frecuencia de los genotipos GG de los rs2255336 y rs2246809 fue similar entre los pacientes con EICH y el grupo sin EICH (0.84 *versus* 0.81, en ambos rs). Con base en lo anterior, los genotipos de los rs1049174, rs2617170 y rs2617171 podrían ser de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.

Tabla 7. Asociación estadística de genotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 con el desarrollo de la EICH

SNP	EICH (n= 99)		Genotipo			Modelo	OR (IC 95%)	p
	Sin EICH (n= 32)		n (Frecuencia)					
rs1049174			CC	CG	GG			
	EICH		33 (0.33)	45 (0.46)	21 (0.21)	Codominante 1	1.56 (0.67-3.63)	0.304
	Sin EICH		16 (0.50)	14 (0.44)	2 (0.06)	Codominante 2	5.09 (1.06-24.43)	0.042*
						Dominante	2.00 (0.89-4.49)	0.093
						Recesivo	4.04 (0.89-18.29)	0.070
						Sobredominante	1.07 (0.48-2.39)	0.866
rs2255336			GG	AG	AA			
	EICH		83 (0.84)	16 (0.16)	0 (0)		0.84 (0.30-2.36)	0.730
	sin EICH		26 (0.81)	6 (0.19)	0 (0)			
rs2617160			TT	AT	AA			
	EICH		36 (0.36)	42 (0.42)	21 (0.21)	Codominante 1	1.33 (0.57-3.10)	0.504
	sin EICH		16 (0.50)	14 (0.44)	2 (0.06)	Codominante 2	4.67 (0.98-22.33)	0.054
						Dominante	1.75 (0.78-3.91)	0.173
						Recesivo	4.04 (0.89-18.29)	0.070
						Sobredominante	0.95 (0.42-2.12)	0.895
rs2246809			GG	AG	AA			
	EICH		83 (0.84)	16 (0.16)	0 (0)		0.84 (0.30-2.36)	0.734
						Aditivo	1.79 (0.99-3.26)	0.047

	sin EICH	26 (0.81)	6 (0.19)	0 (0)			
rs2617170		CC	CT	TT			
	EICH	35 (0.35)	43 (0.43)	21 (0.21)	Codominante 1	1.31 (0.57-3.02)	0.525
	sin EICH	16 (0.50)	15 (0.47)	1 (0.03)	Codominante 2	9.60 (1.19-77.73)	0.034*
					Dominante	1.83 (0.82-4.10)	0.142
					Recesivo	8.35 (1.08-64.75)	0.042*
					Sobredominante	0.87 (0.39-1.94)	0.733
					Aditivo	2.01 (1.08-3.74)	0.021*
rs2617171		GG	CG	CC			
	EICH	35 (0.35)	42 (0.42)	22 (0.22)	Codominante 1	1.28 (0.56-2.95)	0.562
	sin EICH	16 (0.50)	15 (0.47)	1 (0.03)	Codominante 2	10.06 (1.25-81.27)	0.030*
					Dominante	1.83 (0.82-4.10)	0.142
					Recesivo	8.86 (1.14-68.59)	0.037*
					Sobredominante	0.84 (0.38-1.86)	0.659
					Aditivo	2.03 (1.10-3.75)	0.018*
rs1983526		GG	CG	CC			
	EICH	36 (0.36)	41 (0.41)	22 (0.22)	Codominante 1	0.36 (0.12-1.07)	0.066
	sin EICH	5 (0.16)	16 (0.50)	11 (0.34)	Codominante 2	0.28 (0.09-0.91)	0.034*
					Dominante	0.32 (0.12-0.92)	0.033*
					Recesivo	0.55 (0.23-1.30)	0.172
					Sobredominante	0.71 (0.32-1.57)	0.395
					Aditivo	0.55 (0.32-0.95)	0.030*

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido; n: número de individuos; OR: odds ratio, IC 95%: intervalo de confianza; EICH: enfermedad injerto contra hospedero. Las comparaciones se realizaron usando las frecuencias genotípicas del grupo sin EICH como referencia (pacientes que no desarrollaron EICH posterior al TCPH alogénico), *p≤0.05.

El análisis de las frecuencias haplotípicas entre los pacientes con EICH y el grupo sin EICH también mostró diferencias significativas. En la Tabla 8 se observa que la combinación homocigota de los haplotipos GATC/GATC fueron más frecuentes en el grupo de pacientes con EICH que en el grupo sin EICH (0.20 *versus* 0.03, OR= 7.85, $p<0.05$). Por otra parte, el heterocigoto GATC/CTCG no presentó diferencia significativa entre los pacientes con EICH y sin EICH (0.41 *versus* 0.44; respectivamente). Aunque, el homocigoto CTCG/CTCG fue menos frecuente en el grupo de pacientes con EICH que en el grupo sin EICH (0.32 *versus* 0.50, respectivamente) esta diferencia no fue significativa ($p=0.71$). Con base en lo anterior, GATC/GATC podría ser de riesgo para el desarrollo de EICH en pacientes con TCPH alogénico de donador relacionado.

Tabla 8. Asociación estadística de haplotipos con el desarrollo de la EICH

Haplotipos ^a	EICH (n=99) Frecuencia (n)	sin EICH (n=32) Frecuencia (n)	OR	P
GATC/GATC	0.20 (20)	0.03 (1)	7.85 (1.01-61.05)	0.025
GATC/CTCG	0.41 (41)	0.44 (14)	0.91 (0.41-2.03)	0.816
CTCG/CTCG	0.32 (32)	0.50 (16)	0.48 (0.21-1.08)	0.071

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido; EICH: enfermedad injerto contra hospedero; n: número de individuos; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confianza.

Las comparaciones entre grupos se realizaron usando las frecuencias alélicas del grupo sin EICH como referencia (pacientes que no desarrollaron EICH posterior al TCPH alogénico), * $p\leq 0.05$.

^aEl orden de los SNPs en los haplotipos es de acuerdo con su posición en el cromosoma 12 (C/G para el rs1049174, A/T para el rs2617160, C/T para el rs2617170 y C/G para el rs2617171).

6.3. Análisis de los haplotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 y su asociación con la función citotóxica de células NK derivadas de donantes clínicamente sanos.

Con el objetivo de determinar si los haplotipos NKG2 se asociaban a la funcionalidad de las células NK, nosotros llevamos a cabo pruebas de función citotóxica empleando como células blanco la línea celular K562. Brevemente, se enriquecieron las células NK mediante selección negativa a partir de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos, obteniendo una pureza >90% (caracterizadas como células CD56+) (Fig. 6A). Posteriormente fueron co-cultivadas con la línea celular K562 que previamente fue teñida con carboxifluoresceína succinimidil éster (CSFE+) (Fig. 6B). El co-cultivo se llevó a cabo por 4 horas a 37°C (Fig. 6C). Por último, se realizó la tinción de viabilidad con el colorante Zombie Violet. La citotoxicidad fue evaluada como el porcentaje de células CSFE+ Zombie Violet+ (porcentaje de células blanco-muertas posterior al co-cultivo) (Fig. 6D).

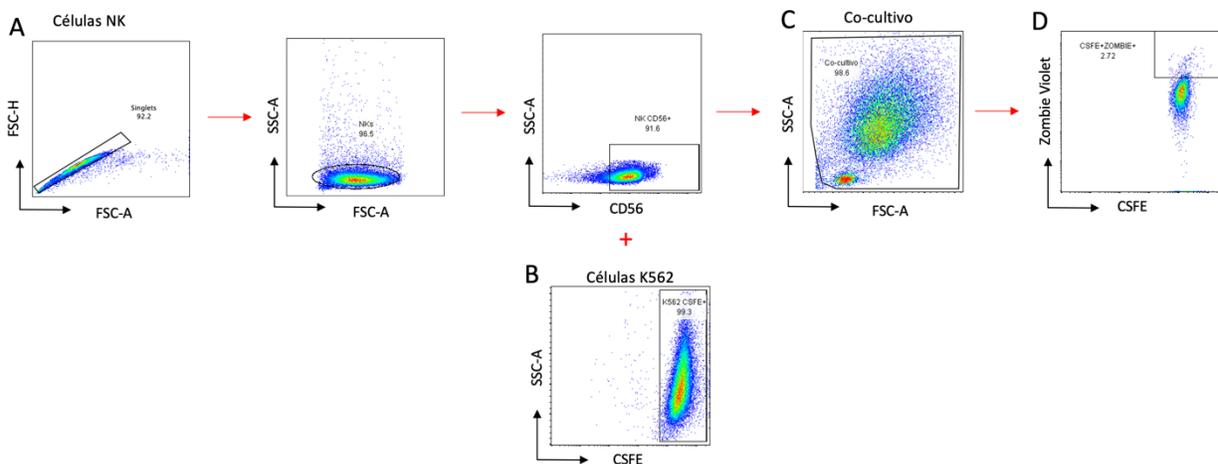


Figura 7. Estrategia de análisis para las pruebas de citotoxicidad.

Las células NK de los donadores se enriquecieron mediante selección negativa y la pureza se evaluó como el % de células CD56+ (>90%) (A). Las células blanco K562 se teñieron con CSFE+ (B) antes de realizar el co-cultivo con las células NK (C). Después del periodo de incubación se evaluó el % de células CSFE+ Zombie Violet+ para determinar la capacidad citotóxica de las células NK hacia las células blanco (D).

Inicialmente en las pruebas de citotoxicidad se emplearon sujetos clínicamente sanos, los cuales eran donadores de pacientes que requerían TCPH. Las células NK fueron co-cultivadas con células K562 para determinar si la capacidad citotóxica era dependiente de su haplotipo hb-1v correspondiente. Aunque las células NK de individuos con la combinación homocigota GATC/GATC presentaron menor capacidad citotóxica que las células NK de individuos con la combinación heterocigota GATC/CTCG (60% *versus* 68%, respectivamente), esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$) (Figura 7). En contraste, las células NK de individuos con la combinación heterocigota GATC/CTCG mostraron mayor capacidad citotóxica que las células NK de individuos con el haplotipo homocigoto CTCG/CTCG (68% *versus* 40%, respectivamente) ($p=0.009$). No obstante que las células NK de individuos con el haplotipo homocigoto GATC/GATC mostraron una tendencia de mayor capacidad citotóxica que los individuos con la combinación homocigota CTCG/CTCG (59% *versus* 42%, respectivamente), esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Con base en lo anterior, el haplotipo CTCG podría estar relacionado a la baja capacidad citotóxica de células NK de sujetos clínicamente sanos (Fig. 7).

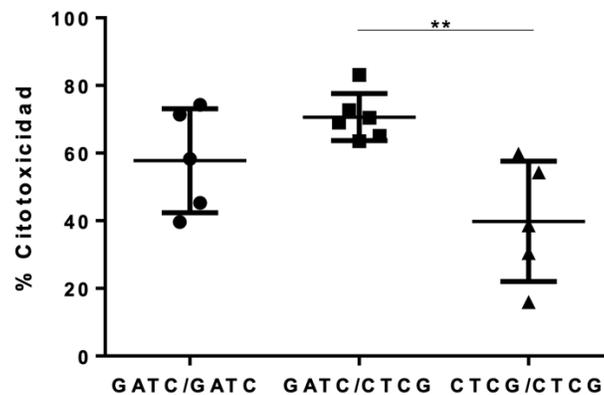


Figura 8. Los haplotipos hb-1v se asocian a la función citotóxica de células NK en donantes clínicamente sanos.

La citotoxicidad de células NK frente a células K562 se determinó en individuos clínicamente sanos que presentaban las siguientes combinaciones de los haplotipos hb-1v: GATC/GATC

(n=5), GATC/CTCG (n=5) y CTCG/CTCG (n=5). Los datos de citotoxicidad se presentan como la media \pm DS, $**p=0.009$, y la significancia estadística se calculó mediante la prueba U Mann-Whitney.

6.4. *Analisis de la expresión génica relativa del receptor NKG2D en pacientes con EICH.*

Dado que la capacidad citotóxica de las células NK esta asociada con la expresión de los receptores de activación celular como NKG2D (79), el aumento de la capacidad citotóxica en pacientes con EICH aguda podría deberse a un aumento de la expresión del receptor NKG2D. Para evaluar esta hipótesis, se determinó la expresión génica relativa del receptor NKG2D (*KLRK1*) en pacientes con y sin EICH aguda al día +70. Los pacientes con EICH aguda mostraron mayor expresión de NKG2D que los pacientes sin la enfermedad ($p=0.009$) (Fig. 8). Por tanto, durante el desarrollo de EICH agudo se observa una sobreexpresión del gen *KLRK1* que codifica para el receptor NKG2D.

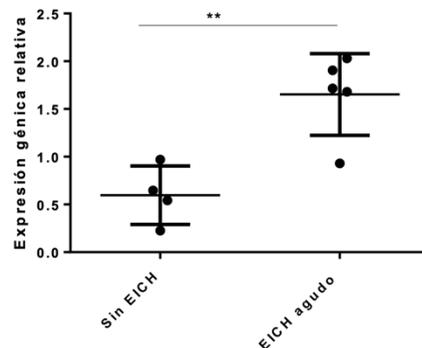


Figura 9. *Sobreexpresión del gen que codifica para el receptor NKG2D en pacientes con enfermedad injerto contra hospedero (EICH).*

La expresión génica relativa del NKG2D se determinó en pacientes sin EICH (n=4) y en pacientes con EICH agudo (n=5) a $+70 \pm 6$ días posterior al TCPH mediante PCR en tiempo real. La expresión génica relativa de NKG2D en cada paciente se calculó utilizando la expresión de NKG2D en el donador de trasplante como referencia y la expresión del gen constitutivo GAPDH como control. Los datos de expresión génica se presentan como la media \pm DS, $**p=0.0041$ y la significancia estadística se calculó mediante la prueba U Mann-Whitney.

6.5. *Análisis de la función citotóxica en células NK de pacientes posterior al TCPH.*

Para tener un panorama de la capacidad funcional citotóxica posterior al trasplante, se determinó la función citotóxica de células NK a diferentes tiempos después del TCPH (70 días, 140 días, así como al momento de aparición de sintomatología de EICH agudo y/o crónico). En el día 70 postrasplante (+70) las células NK presentaron una capacidad citotóxica de 16% (5%-20%), mientras que para el día 140 (+140) esta capacidad citotóxica aumentó ligeramente al 23% (5%-59%) ($p>0.05$) sin que esto se asociara con la aparición de sintomatología de EICH, pérdida de injerto y/o recaída. En contraste, los pacientes con EICH aguda presentaron una capacidad citotóxica mayor que los pacientes sin EICH, al mismo periodo de tiempo postrasplante (68% vs 16%, respectivamente) ($p<0.0001$). Adicionalmente, la capacidad citotóxica de las células NK de pacientes con EICH agudo también fue mayor que los pacientes con EICH crónico (aparición de sintomatología clínica de EICH crónico al día $+140\pm 6$) (65% vs 22%, respectivamente) ($p<0.05$). A pesar de que la capacidad citotóxica de las células NK durante las etapas postrasplante se comparó con la función citotóxica que presentaban sus respectivos donadores relacionados (Don), solo observamos que la capacidad citotóxica al día +70 fue menor que la de los donadores (16% vs 43%, respectivamente) ($p<0.05$). Aunque los pacientes con EICH agudo presentaron una capacidad citotóxica ligeramente mayor a la presentada en los donadores, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$). Por otra parte, los pacientes con EICH crónico presentaron una menor función citotóxica que el grupo de donadores sin que esta diferencia resultara ser estadísticamente significativa (Fig. 9).

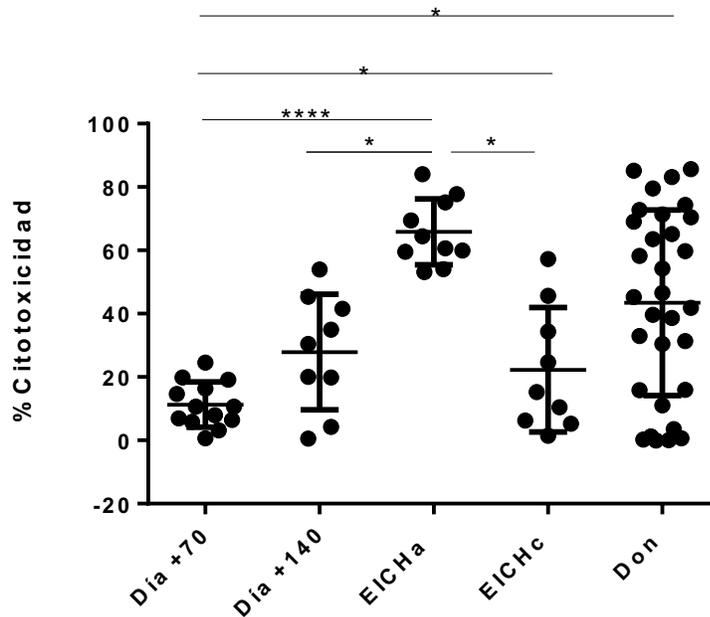


Figura 10. Función citotóxica de células NK posterior al TCPH.

La citotoxicidad de células NK frente a células K562 se determinó en individuos a diferentes periodos de tiempo posterior al TCPH; al día +70 (n=13), +140 (n=9), así como pacientes con EICHa (n=10), EICHc (n=9) y sus respectivos donadores (n=32). Los datos de citotoxicidad se presentan como la media \pm DS, *p=0.05 y ****p=<0.0001, y la significancia estadística se calculó mediante la prueba U Mann-Whitney.

6.6. Asociación de los haplotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 con la expresión del receptor NKG2D en linfocitos T CD8⁺, así como en células NK CD56^{bright} y CD56^{dim} en pacientes con EICH posterior al TCPH.

Con el objetivo de determinar si los niveles del receptor NKG2D en la superficie celular, se asocian con la presencia de los haplotipos hb-1v, se estudió la expresión del receptor NKG2D en linfocitos T CD8⁺, así como en células NK CD56^{bright} (las cuales presentan un fenotipo secretor) y CD56^{dim} (las cuales se han definido por ser células NK con capacidad citotóxica) de pacientes posterior al trasplante, clasificandolos con respecto al haplotipo hb-1v que presentaban. Es decir, pacientes heterocigotos GATC/CTCG, pacientes homocigotos al haplotipo GATC/GATC y pacientes homocigotos a CTCG/CTCG. Tanto en linfocitos T CD8⁺ como en células NK CD56^{bright} y CD56^{dim} la expresión del receptor

NKG2D disminuye gradualmente, siendo los pacientes homocigotos al haplotipo GATC/GATC los que expresan el receptor en mayor cantidad, seguidos por los pacientes heterocigotos (GATC/CTCG) y los pacientes homocigotos a CTCG/CTCG son los que tiene la menor expresión (Fig 10). Sin embargo, estas diferencias en la expresión del receptor NKG2D no fueron estadísticamente significativas en linfocitos T CD8⁺ y CD56^{dim} (Fig. 10A y 10C respectivamente), aunque en las tres poblaciones celulares se observa el mismo comportamiento. En cuanto a células CD56^{bright}, los pacientes con el haplotipo homocigoto CTCG/CTCG mostraron menor expresión del receptor NKG2D que los pacientes heterocigotos (GATC/CTCG) ($p < 0.05$) (Fig. 10B). Por tanto, la expresión del receptor NKG2D se asocia a la presencia de los haplotipos hb-1v en pacientes posterior al TCPH, siendo las células NK CD56^{bright} la población en la que parece más afectada la expresión de receptor.

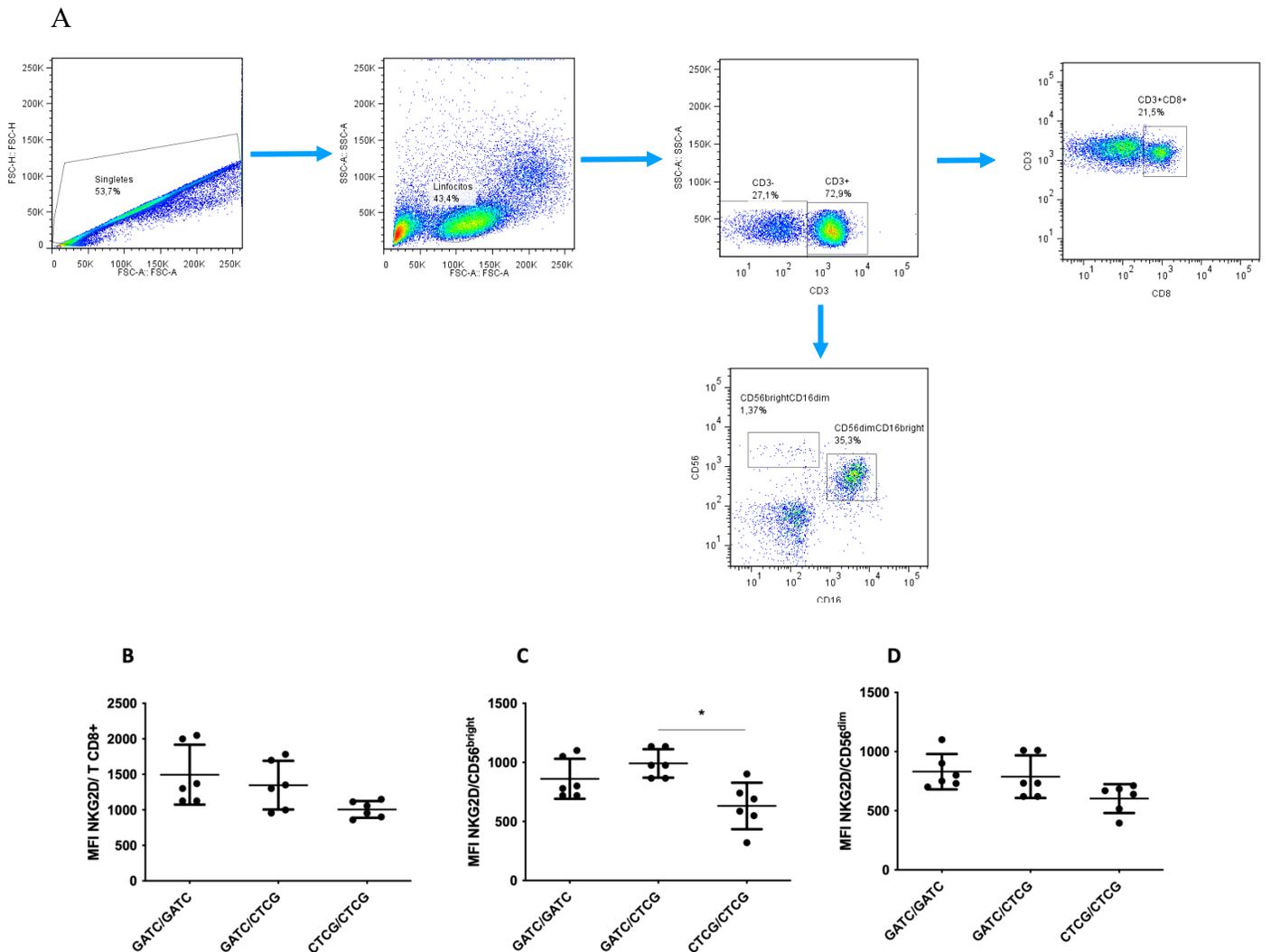


Figura 11. *Expresión del gene que codifica para el receptor NKG2D en presencia de los haplotipos hb-1v en células T CD8+, así como células NK CD56bright y CD56dim posterior al TCPH.*

(A) Estrategia representativa para el análisis de células T CD8⁺ (linaje⁻CD3⁺CD8⁺), así como de células NK CD56bright (linaje⁻CD3⁻CD56^{bright}CD16⁻) y CD56^{dim} (linaje⁻CD3⁻CD56^{dim}CD16⁺). La expresión de NKG2D se determinó en (B) células T CD8⁺, así como en células NK (C) CD56^{bright} y (D) CD56^{dim} de pacientes postrasplante al día +70 clasificándolos con respecto al haplotipo hb-1v presente: GATC/GATC (n=8), GATC/CTCG (n=6) y CTCG/CTCG (n=6). Los datos de expresión se representan como MFI y se presentan como la media ± DS, *p<0.05, y la significancia estadística se calculó mediante la prueba U Mann-Whitney.

6.7. *Análisis de los haplotipos de los SNPs en la familia de genes que codifican para los receptores NKG2 y su asociación con la función citotóxica de las células NK en pacientes postrasplante.*

Para determinar si la diferencia en cuanto a la capacidad citotóxica posterior al trasplante esta asociada a los haplotipos hb1-v, se determinó la capacidad citotóxica de células NK en pacientes homocigotos al haplotipo GATC/GATC, así como en pacientes homocigotos a CTCG/CTCG en el día +70, que es el periodo de tiempo promedio en el que aparecen los primeros síntomas de EICH aguda (70 ±6). Como se puede observar en la Figura 11, los pacientes homocigotos al haplotipo GATC/GATC presentan células NK con mayor capacidad citotóxica que los pacientes homocigotos a CTCG/CTCG (63% ±8 *versus* 20% ±5, p=0.0041). Con base en lo anterior, el haplotipo GATC/GATC se asoció con la mayor capacidad citotóxica de las células NK en pacientes posterior al TCPH. Además, es importante destacar que los pacientes incluidos en el grupo con el haplotipo GATC/GATC presentaron EICH aguda mientras que los pacientes el grupo con el haplotipo CTCG/CTCG no presentaron la enfermedad en este periodo de tiempo.

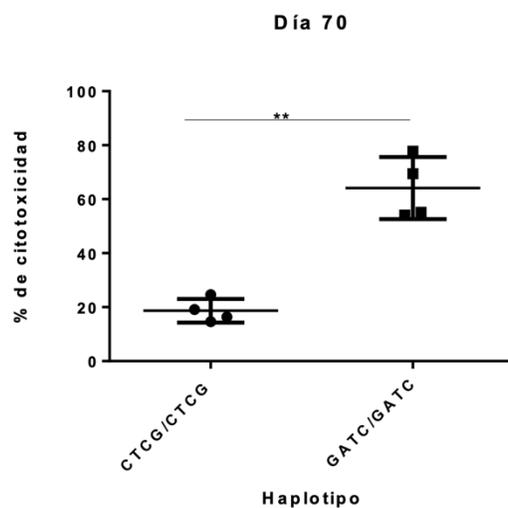


Figura 12. Asociación de la función citotóxica entre los haplotipos *hb-1v* posterior al TCPH.

La citotóxicidad de células NK frente a células K562 se determinó en pacientes al día +70 postrasplante. En este análisis se incluyeron pacientes homocigotos para el haplotipo CTGG (CTGG/CTGG) (n=4) y pacientes homocigotos para el haplotipo GATC (GATC/GATC) (n=4). Los datos de citotoxicidad se presentan como la media \pm DS, $**p=0.0041$, y la significancia estadística se calculó mediante la prueba U Mann-Whitney.

7. Discusion de resultados

La función citotóxica de las células NK se ha asociado con la presencia de siete polimorfismos de un solo nucleotido, rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171 y rs1983526, los cuales se localizan dentro de la región génica que codifica para familia de receptores NKG2 (77). Aunque las frecuencias de los SNPs mencionados anteriormente se han estudiado en diferentes poblaciones, la frecuencia alélica, genotípica y haplotípica de estos SNPs era desconocida en población mexicana. Por tanto, este estudio permitió conocer la distribución de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los SNPs de la familia de genes NKG2 en población mexicana, así como sus diferencias entre otras poblaciones. La cual es evidente al comparar con las poblaciones japonesa, africana, europea y asiática, siendo la población de Los Angeles California de ascendencia mexicana la que presenta más similitud con nuestra población. Aunque existe similitud en cuanto a la distribución de los rs2233336, rs2246809 y rs1983526 entre la población de ascendencia mexicana que vive en Los Ángeles, California, EE. UU. y nuestra población, las frecuencias de los alelos C (rs1049174), T (rs2617160), C (rs2617170) y G (rs2617171) fue diferente entre ambas poblaciones. La diferencia podría deberse a que la población de Los Ángeles CA aunque tiene ascendencia Mexicana proviene de diferentes lugares del país, mientras que la población que comprende el presente estudio fue residente del Valle de México (98% de la población correspondió a Ciudad de México y Estado de México). Como se ha descrito el componente de ascendencia en la población mexicana varía según el área geográfica de origen, en el norte y oeste de México predomina la ascendencia europea (66.7-95%), mientras que el centro y sureste es la ascendencia amerindia (37-50%) (87). El componente de ascendencia de la población de la Ciudad de México incluye 69.2% de genes amerindios, 30,2% de genes europeos y 0,6% de genes africanos. Debido al componente de ascendencia amerindia en la población de la Ciudad de México, este estudio pretendía comparar la distribución de las frecuencias encontradas en nuestra población de estudio con las reportadas para población Amerindia en la base de datos del Proyecto de Diversidad del Genoma Humano (88). Sin embargo, no existen datos de genotipificación disponibles para los SNP estudiados en la población Amerindia. Esta diversidad en la

distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de SNPs dentro y entre poblaciones está dada por fuerzas aleatorias (deriva genética) y deterministas (selección natural) ejercidas en cada población (89–91).

La genotipificación de todos los SNP del genoma humano puede ser un proceso innecesario debido al desequilibrio de ligamiento (LD) entre miles de SNPs (92). El LD se describe como no independencia entre alelos de múltiples *locus*, por lo que alelos implicados en esta dependencia constituyen un haplotipo (93). Aunque se ha referido que los SNP analizados en el presente estudio muestran LD y generan haplotipos (77), la conformación y distribución de estos haplotipos NKG2 no había sido estudiada en población mexicana. Por lo tanto, se realizó un análisis de LD de los rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171 y rs1983526 para determinar si presentaban LD, así como las frecuencias de tales haplotipos en nuestra población. Los rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171 presentaron LD ($r^2 \geq 0.80$) por lo que conformaron un bloque de haplotipos. Este bloque de haplotipos se denominó como hb-1v debido a que este es una variante del haplotipo hb-1 reportado en población japonesa (77), ya que no presenta LD con el rs1983526. Por tanto, el hb-1v está restringido a la región KLRC4-KLRK1 y comprende a los rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171.

Aunque los rs2255336 y rs2246809 mostraron frecuencias similares en nuestra población, estos SNPs presentaron LD débil ($r^2 = 0.78$). Como el valor de r^2 entre estos SNP no superó 0.80 para considerar que forman un haplotipo, se estimó el LD usando otro marcador como es D', obteniendo un valor de 0.89. Se ha descrito previamente que la estimación LD usando r^2 es poco efectiva para pares de SNPs cuyos alelos menores sean poco frecuentes, como es el caso de los rs2255336 y rs2246809 cuyos alelos menores presentan una frecuencia de 0.071 y 0.070, respectivamente. Por lo tanto, el valor de r^2 entre estos SNP puede no indicar necesariamente la falta de LD para estos marcadores, sino más bien es probable que refleje el bajo poder para detectar LD entre ambos SNPs (92,94). También se ha reportado que las diferencias de LD entre poblaciones es el resultado de diferentes eventos históricos (95). De hecho, un solo evento de mutación puede dar lugar a un alelo mutado en una población específica, y

este alelo puede haberse extendido y cambiado en frecuencia con el tiempo, debido a algunos eventos evolutivos como la recombinación, deriva genética, mutación, migración, tasa de recombinación, y selección natural. Como resultado, estos eventos han dado lugar a patrones específicos de LD para cada población (96–98).

Adicionalmente, la comparación entre los bloques de haplotipos hb-1v y hb-1 reveló algunos hallazgos interesantes. Para hb-1v, se identificaron dos haplotipos predominantes según el contenido del alelo. El haplotipo más común fue CTCG, seguido del haplotipo GATC (correspondiente a alelos de los rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171, respectivamente para ambos haplotipos). Con base en lo anterior, tanto la combinación de alelos como los SNPs asociados en haplotipos son diferentes entre los bloques hb1v y hb-1. El alelo G del rs2617171 y no el alelo C (como había sido reportado en población japonesa) conforma el haplotipo CTCG, mientras que el alelo C y no el alelo G conforma el haplotipo GATC. Por consiguiente, el bloque hb-1v, descrito en población mexicana, incluye los haplotipos CTCG y GATC los cuales se conforman por los rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171 respectivamente. Mientras que el bloque hb-1 incluye los haplotipos CTCC y GATG correspondiente a los rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171 y rs1983526 respectivamente (77).

El LD entre los polimorfismos permite la selección de un SNP etiqueta para el haplotipo completo (93,99). Por esta razón, el rs1049174 se ha caracterizado como un SNP etiqueta para el haplotipo hb-1 (100,101) y nosotros lo corroboramos para el haplotipo hb-1v en población mexicana. El rs1049174 se encuentra en la región 3'-no traducida (3'-UTR) del gen *KLRK1*, que es un sitio de unión para el microRNA (miR-1245), el cual tiene una función esencial en la regulación negativa de la expresión del receptor NKG2D (100). NKG2D es un receptor de activación y/o de coestimulación expresado tanto en linfocitos T CD8⁺ como en células NK (102). La interacción entre NKG2D y sus ligandos (MICA, MICB y ULBPs) desencadena la lisis celular a través de la secreción de perforina, granzimas y la activación de caspasas (103). De hecho, el rs1049174 se ha asociado con la regulación de la expresión del receptor NKG2D (77,100,104). Debido a que el haplotipo hb-1v está restringido a la región KLRC4-KLRK1, podríamos sugerir que también el hb-1v está asociado con la función citotóxica de las células NK,

probablemente debido a la regulación negativa de la expresión de NKG2D. Por lo tanto, nuestros resultados confirman la utilidad del rs1049174 como SNP etiqueta, el cual podría usarse para futuros estudios de asociación genética con enfermedades. Al respecto, este SNP etiqueta, así como el resto de los SNPs que constituyen este haplotipo (rs2617160, rs2255336, rs2617160, rs2244809, rs2617170, rs2617171 y rs1983526) se ha asociado con algunas afecciones, como el aborto espontáneo recurrente, lupus eritematoso sistémico, hepatitis B crónica, algunos tipos de cáncer (cáncer de estómago, pulmón, colorrectal y cervical), así como con mejoría en la respuesta a algunos fármacos (77,100,101,105–113).

En el desarrollo de la enfermedad injerto contra hospedero (EICH) participan células con actividad citotóxica del donador sobre tejido sano del receptor como NK y T CD8⁺ (24,114). A pesar de que la función citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ y NK esta asociada a la presencia de los rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2244809, rs2617170, rs2617171 y rs1983526 localizados en la región génica que codifica para la familia de receptores NKG2 (77,104), se desconoce si estos SNPs están relacionados con el desarrollo de la EICH posterior al TCPH alogénico. Con base en lo anterior, este estudio analizó la asociación de los rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2244809, rs2617170, rs2617171 y rs1983526 con desarrollo de EICH.

El presente estudio incluyó una cohorte de pacientes sometidos a TCPH que desarrollaron o no EICH, así como el análisis de diferentes variables que se han asociado a su desarrollo posterior al TCPH (30,115). El análisis de regresión logística multivariable mostró que la compatibilidad de HLA, compatibilidad de género entre donador y receptor, edad de donador y receptor, régimen de acondicionamiento, incompatibilidad ABO e infusión de linfocitos del donador (ILD) no se asociaron al desarrollo de EICH. Aunque nuestra cohorte fue de 131 pacientes, algunos grupos de nuestro estudio incluyeron menos de 10 pacientes y es conveniente que el estudio de estas variables debe de realizarse con al menos de 10 a 20 individuos por grupo, para garantizar un análisis más preciso (116). A pesar de que las variables mencionadas anteriormente podrían ser importantes para el desarrollo de la enfermedad, el tamaño de nuestra cohorte de pacientes hizo imposible evidenciar que estos factores esten asociados con EICH.

Además, el análisis no incluyó variables como la profilaxis de la EICH y la fuente del injerto porque todos nuestros pacientes se sometieron a un trasplante con las células troncales de sangre periférica movilizada y también fueron tratados con el mismo esquema de profilaxis para EICH. En el periodo postrasplante, la aparición de EICH se asoció con la recaída de la enfermedad y la supervivencia postrasplante como ya ha sido documentado en otros estudios (117).

El análisis de asociación de los rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2244809, rs2617170, rs2617171 y rs1983526 con el desarrollo de la EICH permitió describir hallazgos importantes. En cuanto a alelos, los alelos G de rs1049174, A de rs2617160, T de rs2617170 y C de rs2617171 se asociaron como alelos de riesgo para el desarrollo de EICH, mientras que el alelo C del rs1983526 fue de protección para la enfermedad. El análisis de genotipos también mostró que los genotipos homocigotos para los alelos mencionados anteriormente de los rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171 fueron de riesgo, mientras que el homocigoto del alelo C del rs1983526 fue de protección para el desarrollo de EICH. Finalmente, el haplotipo GATC/GATC, conformado por los alelos rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171, también se asoció con riesgo a padecer esta enfermedad postrasplante. Aunque en este estudio se describe la asociación del haplotipo GATC/GATC con el desarrollo de EICH, podría haber sido interesante determinar si dicha asociación correspondía a EICH aguda y/o crónica. Sin embargo, el tamaño de nuestra cohorte fue pequeño y nos impidió realizar dicho análisis de asociación. Por tanto, sería interesante el estudio de estos SNPs en cohortes con tamaños de muestra más grandes para poder discriminar entre la asociación con la enfermedad aguda o crónica postrasplante.

En este estudio, encontramos que el haplotipo GATC (conformado por los rs1049174, rs2617160, rs2617170 y rs2617171) se asocia con el desarrollo de EICH. Dado que el rs1049174 se ha caracterizado como un SNP etiqueta para el haplotipo GATC, este SNP puede ser responsable de la asociación encontrada. Como se mencionó anteriormente, este SNP se encuentra en la región 3'UTR del gen *KLRK1* que es un sitio blanco para la unión del microARN-1254 (miR-1245), el cual es un regulador negativo de la expresión del receptor NKG2D (118). Por tal motivo, la presencia del alelo G de rs1049174 dentro

de esta región podría afectar la afinidad por miR-1245, favoreciendo la expresión del receptor NKG2D. Por tanto, el haplotipo GATC podría estar involucrado en la sobreexpresión del receptor NKG2D después del TCPH, lo cual podría estar asociado a la actividad citotóxica alorreactiva para causar daño al tejido sano durante la EICH. Aunque estos haplotipos se han asociado a mejores resultados clínicos posterior al TCPH, estos SNPs no se han asociado con el desarrollo de EICH (119).

Dado que la expresión del receptor NKG2D en los linfocitos es crítica para mediar la citotoxicidad contra las células leucémicas (120,121), es probable que estos haplotipos también puedan mejorar el efecto injerto contra leucemia postrasplante. En consecuencia, en este estudio incluimos el análisis de la asociación entre los haplotipos hb-1v y la recaída después de un TCPH. Los pacientes con el haplotipo GATC/GATC mostraron una tendencia de menor riesgo de recaída que los pacientes con el haplotipo CTCG/CTCG, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Aunque el haplotipo GATC se ha asociado a mayor expresión de NKG2D, no se encontró que este estuviera asociado a mejor respuesta antitumoral (menor riesgo de recaída). Lo anterior podría deberse a que las células malignas exhiben diversos mecanismos para evitar el reconocimiento inmunológico mediado por NKG2D. Los mecanismos más ampliamente estudiados para evitar el reconocimiento inmunológico mediado por NKG2D incluyen el desprendimiento (122–124) y silenciamiento aberrante de los ligandos de NKG2D como consecuencia del microambiente tumoral (125,126). Ambos mecanismos mencionados reducen la densidad de expresión del ligando NKG2D en la superficie celular, impidiendo su eliminación por las células citotóxicas y permitiendo la propagación tumoral (127). En conjunto, estos datos sugieren que algunas células leucémicas pueden volverse menos susceptibles al reconocimiento de los linfocitos citotóxicos, lo que permitiría una recaída después del trasplante a pesar de la presencia del haplotipo hb-1v de los linfocitos citotóxicos alorreactivos.

Debido a que el haplotipo GATC/GATC se asocia con el desarrollo de EICH y que esta enfermedad es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad después del TCPH, este estudio también incluyó un análisis de asociación del haplotipo GATC/GATC con la supervivencia postrasplante. Los pacientes con el haplotipo GATC/GATC

mostraron tasas de supervivencia más bajas que los pacientes con el haplotipo CTCG/CTCG, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Debido a que el haplotipo GATC/GATC está relacionado con el desarrollo de EICH y que los pacientes con EICH reciben profilaxis con inmunosupresores, nuestros resultados sugieren que las tasas de mortalidad más altas en pacientes con el haplotipo GATC/GATC podrían ser consecuencia de una mayor administración de inmunosupresores para la prevención de la enfermedad, lo que los hace más susceptibles a infecciones. De hecho, las infecciones fueron la causa de muerte más frecuente después del TCPH en pacientes con el haplotipo GATC/GATC (datos no mostrados). Estos datos sugieren que el haplotipo GATC/GATC puede ser clínicamente relevante para la supervivencia posterior al TCPH. De acuerdo con nuestros resultados, un estudio previo reportó que pacientes sometidos a TCPH no relacionado y que tenían el haplotipo GATGG/GATGG (conformado por los rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171 y rs1983526, respectivamente), el cual es una variante de GATC/GATC y que también contiene el rs1049174 (asociado con actividad citotóxica), mostraron una mayor mortalidad asociada al trasplante (119).

Los haplotipos de los receptores NKG2 se han asociado a la capacidad funcional de células NK. Inicialmente, la capacidad citotóxica de células NK se analizó dependiendo del haplotipo presente GATC/GATC, GATC/CTCG, y CTCG/CTCG en sujetos clínicamente sanos. En nuestros resultados se observa que las células NK de los individuos homocigotos CTCG/CTCG presentaron menor capacidad que los sujetos heterocigotos GATC/CTCG. Lo anterior concuerda con lo previamente reportado para el haplotipo hb-1 (77).

Posterior al TCPH, se ha reportado un aumento en la expresión de receptores de la familia NKG2 (73). Con el objetivo de analizar la expresión del receptor activador NKG2D se evaluó su expresión, así como la actividad citotóxica de células NK en pacientes posterior al TCPH, en específico en el momento de desarrollo de EICH. Nuestros resultados indican que durante el desarrollo de EICH hay sobreexpresión del receptor NKG2D. Además, la capacidad funcional de las células NK se observa aumentada en los pacientes con esta enfermedad. Los resultados anteriores correlacionan con lo reportado previamente, donde la expresión de este receptor se observa en periodos postrasplante;

además la expresión de este receptor se ve aumentada en tejido afectado por EICH (73). Por otra parte, se ha reportado que las células NK de pacientes postrasplante presentan una capacidad funcional citotóxica aumentada (73), sin que esto se haya asociado previamente a EICH.

Finalmente, la sobreexpresión del receptor NKG2D y el aumento en la capacidad citotóxica funcional de NK se asocia con la presencia de los haplotipos hb-1v. La expresión del receptor NKG2D en linfocitos T CD8⁺, así como NK CD56^{bright} y CD56^{dim} de los pacientes posterior al TCPH presenta una tendencia a disminuir, observando más expresión del receptor en los pacientes homocigotos GATC, una expresión intermedia en los heterocigotos GATC/CTCG y la menor expresión en los pacientes homocigotos al haplotipo CTCG. Aunque la expresión muestra la misma tendencia en las tres poblaciones celulares, esta diferencia únicamente resultó estadísticamente significativa en células CD56^{bright}. Clásicamente la población de células CD56^{bright} se ha descrito como una población celular secretora de citocinas (128,129). Posterior al TCPH la población de CD56^{bright} también presenta incrementada secreción de citocinas, además de tener aumentada la capacidad citotóxica (73).

Se ha reportado que la presencia y la funcionalidad de células NK esta asociada al desarrollo de EICH. De hecho, una disminución en la actividad y cantidad se asocian a menor supervivencia, así como a mayor desarrollo de EICH postrasplante (120). Dado que las células NK son mediadores esenciales en el desarrollo de EICH, entonces la disminución en la expresión del receptor activador, así como en la capacidad citotóxica de las células NK posterior al TCPH alogénico relacionado podrían explicar la asociación del haplotipo CTCG con el desarrollo de EICH.

8. Conclusiones

Durante el desarrollo de la EICH participan células aloreactivas cuya función biológica se ha asociado a la presencia de SNPs en la familia de receptores NKG2.

1. El haplotipo GATC se asocia con el riesgo al desarrollo de EICH en pacientes posterior al TPCH alogénico de donador relacionado.
2. El haplotipo CTCG se encuentra asociado con protección para el desarrollo de esta enfermedad.
3. El receptor de activación NKG2D se sobreexpresa durante el desarrollo de EICH aguda, mientras que las células NK presentan aumento en la actividad citotóxica.
4. El haplotipo CTCG se asocia con una disminución en los niveles del receptor NKG2D en la superficie celular de células NK CD56^{high}, así como con una disminución en la capacidad citotóxica.

9. Perspectivas

Aunque la presencia del haplotipo CTCG se asocia a una disminución en la expresión génica de *KLRK1* que codifica para el receptor NKG2D, así como los niveles de este receptor en células NK CD56^{bright} sería interesante aumentar el tamaño de muestra para corroborar nuestros resultados.

Dada la disminución en la expresión del receptor NKG2D asociada al haplotipo CTCG sería interesante evaluar si existe una menor activación de las vías de señalización río debajo de este receptor de activación. Lo anterior con el objetivo de determinar si la disminución de la expresión de NKG2D se asocia con menor activación celular, así como menor producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias que han sido asociadas al desarrollo de EICH.

10. Referencias

1. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol*. 2019 Nov 19;9.
2. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):340–52.
3. Koyama M, Hill GR. Alloantigen presentation and graft-versus-host disease: Fuel for the fire. *Blood*. 2016;127(24):2963–70.
4. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014 Jul 17;124(3):344–53.
5. Copelan EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. 2006;1813–26.
6. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2009 Dec;15(12):1628–33.
7. Weisdorf DJ. Reduced-intensity versus myeloablative allogeneic transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017 Dec;10(4):321–6.
8. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(26):2565–79.
9. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol*. 2016 Nov;37(11):724–37.
10. Li HW, Sykes M. Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012;12(6):403–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3226>
11. Chen SH, Wang TF, Yang KL. Hematopoietic stem cell donation. *Int J Hematol*. 2013;97(4):446–55.
12. Bensinger WI. Allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2012 Mar;24(2):191–6.
13. Couban S. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood*. 2002 Aug 13;100(5):1525–31.
14. Amouzegar A, Dey BR, Spitzer TR. Peripheral Blood or Bone Marrow Stem Cells? Practical Considerations in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfus Med Rev*. 2019 Jan;33(1):43–50.
15. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Nov 1;36(9):757–69.
16. Styczyński J, Tridello G, Koster L, et al. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jan 27;55(1):126–36.
17. Ferrara JLM, Chaudhry MS. GVHD: Biology matters. *Blood Adv*. 2018;2(22):3411–7.

18. Markey KA, Takashima S, Hanash AM, et al. Cytokines in GVHD and GVL [Internet]. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Elsevier Inc.; 2019. 293–322 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812630-1.00017-7>
19. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007 Apr 1;25(1):139–70.
20. Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):273–8.
21. Ghimire S, Weber D, Mavin E, et al. Pathophysiology of GvHD and other HSCT-related major complications. *Front Immunol*. 2017;8(MAR).
22. Zeiser R, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease - Biologic process, prevention, and therapy. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(22):2167–79.
23. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005 Dec;11(12):945–56.
24. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, et al. Graft-versus-host disease. *The Lancet* 2009;373(9674):1550–61.
25. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012;119(1):296–307.
26. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, et al. Comparative Analysis of Risk Factors for Acute GvHD and for Chronic GvHD disease according to NIH consensus Criteria. *Blood* [Internet]. 2011;117(11):3214–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/117/11/3214.full.pdf>
27. Ferrara JLM. Cytokines and Cellular Effectors Phase One : Host Tissue Damage. *J Hematother*. 2000;306:299–306.
28. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;124(3):374–84.
29. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [Internet]. 2015;21(3):389-401.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.001>
30. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3214–9.

31. Wu T, Young JS, Johnston H, et al. Thymic Damage, Impaired Negative Selection, and Development of Chronic Graft-versus-Host Disease Caused by Donor CD4 + and CD8 + T Cells . *The Journal of Immunology*. 2013;191(1):488–99.
32. Sarantopoulos S, Ritz J. Aberrant B-cell homeostasis in chronic GVHD. *Blood*. 2015;125(11):1703–7.
33. Srinivasan M, Flynn R, Price A, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2012;119(6):1570–80.
34. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* (1979). 2004;306(5701):1517–9.
35. Paul S, Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2017;8(SEP).
36. Abel AM, Yang C, Thakar MS, et al. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol*. 2018;9(AUG):1–23.
37. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, et al. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2021 Jan 19;124(2):359–67.
38. Bettini ML, Guy C, Dash P, et al. Membrane Association of the CD3ε Signaling Domain Is Required for Optimal T Cell Development and Function. *The Journal of Immunology*. 2014 Jul 1;193(1):258–67.
39. Ngoenkam J, Schamel WW, Pongcharoen S. Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor–CD3 complex. *Immunology*. 2018 Jan 5;153(1):42–50.
40. Furlan G, Minowa T, Hanagata N, et al. Phosphatase CD45 Both Positively and Negatively Regulates T Cell Receptor Phosphorylation in Reconstituted Membrane Protein Clusters. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Oct;289(41):28514–25.
41. Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature*. 1996 Dec 12;384(6609):577–81.
42. Gordy C, He YW. Endocytosis by target cells: an essential means for perforin- and granzyme-mediated killing. *Cell Mol Immunol*. 2012 Jan 19;9(1):5–6.
43. Basu R, Whitlock BM, Husson J, et al. Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell*. 2016 Mar;165(1):100–10.
44. Fu Q, Fu TM, Cruz AC, et al. Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor. *Mol Cell*. 2016 Feb;61(4):602–13.
45. Yokoyama WM, Plougastel BFM. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr 1;3(4):304–16.
46. 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 Feb;38(9):637–60.

47. Borrego F, Masilamani M, Kabat J, et al. The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Mol Immunol*. 2005;42(4 SPEC. ISS.):485–8.
48. Braud VM, Allan DSJ, O’Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391(6669):795–9.
49. Stojanovic A, Correia MP, Cerwenka A. The NKG2D/NKG2DL axis in the crosstalk between lymphoid and myeloid cells in health and disease. *Front Immunol*. 2018;9(APR):1–15.
50. Quatrini L, Molfetta R, Zitti B, et al. Ubiquitin-dependent endocytosis of NKG2D-DAP10 receptor complexes activates signaling and functions in human NK cells. *Sci Signal*. 2015;8(400):1–11.
51. Duan S, Guo W, Xu Z, et al. Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1–14.
52. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, et al. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cell by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2(3):255–60.
53. Markiewicz MA, Carayannopoulos LN, Naidenko O V., et al. Costimulation through NKG2D Enhances Murine CD8 + CTL Function: Similarities and Differences between NKG2D and CD28 Costimulation. *The Journal of Immunology*. 2005;175(5):2825–33.
54. Roberts AI, Lee L, Schwarz E, et al. Cutting Edge: NKG2D Receptors Induced by IL-15 Costimulate CD28-Negative Effector CTL in the Tissue Microenvironment. *The Journal of Immunology*. 2001;167(10):5527–30.
55. López-Larrea C, Suárez-Alvarez B, López-Soto A, et al. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med*. 2008;14(4):179–89.
56. Correia MP, Cardoso EM, Pereira CF, et al. Hepatocytes and IL-15: A Favorable Microenvironment for T Cell Survival and CD8 + T Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. 2009;182(10):6149–59.
57. Correia MP, Costa A V., Uhrberg M, et al. IL-15 induces CD8+ T cells to acquire functional NK receptors capable of modulating cytotoxicity and cytokine secretion. *Immunobiology*. 2011;216(5):604–12.
58. Tang F, Chen Z, Ciszewski C, et al. Cytosolic PLA 2 is required for CTL- Mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(3):707–19.
59. Jabri B, Abadie V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(12):771–83.
60. Wensveen FM, Lenartić M, Jelenčić V, et al. NKG2D Induces Mcl-1 Expression and Mediates Survival of CD8 Memory T Cell Precursors via Phosphatidylinositol 3-Kinase. *The Journal of Immunology*. 2013;191(3):1307–15.

61. Kong Y, Cao W, Xi X, et al. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR γ 9/ δ 2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR γ δ and NKG2D. *Blood*. 2009;114(2):310–7.
62. Poggi A, Venturino C, Catellani S, et al. V δ 1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res*. 2004;64(24):9172–9.
63. Lança T, Correia D V., Moita CF, et al. The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to γ δ T-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(12):2407–11.
64. Garcia-Chagollan M, Jave-Suarez LF, Haramati J, et al. Substantial increase in the frequency of circulating CD4+NKG2D+ T cells in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *J Biomed Sci*. 2013;20(1):1–11.
65. Carapito R, Bahram S. evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev*. 2015;267:88–116.
66. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):737–44.
67. Ball LM, Egeler RM. Acute GvHD: Pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(SUPPL. 2):58–64.
68. Jelenčić V, Lenartić M, Wensveen FM, et al. NKG2D: A versatile player in the immune system. *Immunol Lett*. 2017;189(April):48–53.
69. Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, et al. In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *PLoS One*. 2007 Jun 13;2(6):e518.
70. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005 Aug 3;436(7054):1186–90.
71. Tang KF, He CX, Zeng GL, et al. Induction of MHC class I-related chain B (MICB) by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jun;370(4):578–83.
72. Gannagé M, Buzyn A, Bogiatzi SI, et al. Induction of NKG2D Ligands by Gamma Radiation and Tumor Necrosis Factor- α May Participate in the Tissue Damage During Acute Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation*. 2008 Mar 27;85(6):911–5.
73. Dulphy N, Haas P, Busson M, et al. An Unusual CD56^{bright} CD16^{low} NK Cell Subset Dominates the Early Posttransplant Period following HLA-Matched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *The Journal of Immunology*. 2008 Aug 1;181(3):2227–37.
74. Boyiadzis M, Memon S, Carson J, et al. Up-regulation of NK Cell Activating Receptors Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation under a

- Lymphodepleting Reduced Intensity Regimen is Associated with Elevated IL-15 Levels. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2008 Mar;14(3):290–300.
75. Karimi MA, Bryson JL, Richman LP, et al. NKG2D expression by CD8+ T cells contributes to GVHD and GVT effects in a murine model of allogeneic HSCT. *Blood*. 2015 Jun 4;125(23):3655–63.
 76. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. 2000;356:1795–9.
 77. Hayashi T, Imai K, Morishita Y, et al. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res*. 2006;66(1):563–70.
 78. Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, et al. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* [Internet]. 1998;48(3):163–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683661>
 79. Imai K, Hayashi T, Yamaoka M, et al. 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. *Hum Immunol* [Internet]. 2012;73(6):686–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2012.03.003>
 80. Copelan EA. Conditioning regimens for allogeneic bone marrow transplantation. *Blood Rev*. 1992 Dec;6(4):234–42.
 81. Uberti JP, Agovi MA, Tarima S, et al. Comparative analysis of BU and CY versus CY and TBI in full intensity unrelated marrow donor transplantation for AML, CML and myelodysplasia. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Jan 19;46(1):34–43.
 82. Lei Xiao-Ru, Chen Hong-Li, Wang Fang-Xia, et al. Busulfan plus fludarabine compared with busulfan plus cyclophosphamide. *Int J Clin Exp Med* [Internet]. 2015;8(8):12064–75. Available from: <http://www.ohri>.
 83. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295–304.
 84. Miller SA, Gallie DR, Sleat DE, et al. Volume 16 Number 3 1988 *Nucleic Acids Research*. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):883–93.
 85. Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263–5.
 86. View genotype frequency data for a gene, disease or short genetic variation [Internet]. [cited 2023 Aug 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/view-gen-freq/>
 87. Martínez-Cortés G, Salazar-Flores J, Haro-Guerrero J, et al. Maternal admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on mtDNA haplogroups. *Am J Phys Anthropol*. 2013;151(4):526–37.

88. Li JZ, Absher DM, Tang H, et al. Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation. *Science* (1979). 2008 Feb 22;319(5866):1100–4.
89. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68–74.
90. Barreiro LB, Laval G, Quach H, et al. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet*. 2008;40(3):340–5.
91. Fu W, Akey JM. Selection and Adaptation in the Human Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2013;14(1):467–89. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genom-091212-153509>
92. Abecasis GR, Ghosh D, Nichols TE. Linkage disequilibrium: Ancient history drives the new genetics. *Hum Hered*. 2005;59(2):118–24.
93. Liao B, Wang X, Zhu W, et al. New multilocus linkage disequilibrium measure for tag SNP selection. *J Bioinform Comput Biol*. 2017;15(1):1–16.
94. Pritchard 2001. Linkage Disequilibrium in Humans: Models and Data. *Am J Hum Genet*. 1979;(57):1–14.
95. Goddard KAB, Hopkins PJ, Hall JM, et al. Linkage Disequilibrium and Allele-Frequency Distributions for 114 Single-Nucleotide Polymorphisms in Five Populations. *The American Journal of Human Genetics*. 2000;66(1):216–34.
96. Eberle MA, Rieder MJ, Kruglyak L, et al. Allele frequency matching between SNPs reveals an excess of linkage disequilibrium in genic regions of the human genome. *PLoS Genet*. 2006;2(9):1319–27.
97. Sved JA, McRae AF, Visscher PM. Divergence between Human Populations Estimated from Linkage Disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 2008;83(6):737–43.
98. Wang N, Akey JM, Zhang K, et al. Distribution of Recombination Crossovers and the Origin of Haplotype Blocks: The Interplay of Population History, Recombination, and Mutation. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;71(5):1227–34.
99. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* (1979). 2002;296(5576):2225–9.
100. Luis Espinoza J, Nguyen VH, Ichimura H, et al. A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. *Sci Rep*. 2016;6(December):1–12.
101. Furue H, Matsuo K, Kumimoto H, et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. *Carcinogenesis*. 2008;29(2):316–20.
102. Wensveen FM, Jelenčić V, Polić B. NKG2D: A master regulator of immune cell responsiveness. *Front Immunol*. 2018;9(MAR).
103. Zingoni A, Molfetta R, Fionda C, et al. NKG2D and its ligands: “One for all, all for one.” *Front Immunol*. 2018;9(MAR).

104. Imai K, Hayashi T, Yamaoka M, et al. 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. *Hum Immunol.* 2012;73(6):686–91
105. Hizem S, Mtiraoui N, Massaoudi S, et al. Polymorphisms in Genes Coding for the NK-Cell Receptor NKG2D and its Ligand MICA in Recurrent Miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2014;72(6):577–85.
106. Roszak A, Lianeri M, Jagodziński PP. Prevalence of the *NKG2D* Thr72Ala Polymorphism in Patients with Cervical Carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(8):841–5.
107. Asadi-Saghandi A, Shams A, Eslami G, et al. Peginterferon Alfa-2a/Ribavirin treatment efficacy in chronic hepatitis C patients is related to natural killer group 2D gene rs1049174 GC polymorphism. *Virusdisease.* 2016;27(4):369–74.
108. Iwaszko M, Świerkot J, Kolossa K, et al. Influence of NKG2D Genetic Variants on Response to Anti-TNF Agents in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Genes (Basel).* 2018 Feb 1.
109. Yang Y, Tan H, Deng B, et al. Genetic polymorphisms of C-type lectin receptors in Behçet's disease in a Chinese Han population. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–9.
110. Sousa I, Shahram F, Francisco D, et al. Brief report: association of CCR1, KLRC4, IL12A-AS1, STAT4, and ERAP1 With Behçet's disease in Iranians. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(10):2742–8.
111. Ma J, Guo X, Wu X, et al. Association of NKG2D genetic polymorphism with susceptibility to chronic hepatitis B in a Han Chinese population. *J Med Virol* [Internet]. 2010 Sep [cited 2023 Feb 18];82(9):1501–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20648603/>
112. Piotrowski P, Lianeri M, Olesińska M, et al. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):1343–7.
113. Kabalak G, Thomas RM, Martin J, et al. Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. *Hum Immunol.* 2010;71(1):74–8.
114. Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: Hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(2):108–22.
115. Grube M, Holler E, Weber D, et al. Risk Factors and Outcome of Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation—Results from a Single-Center Observational Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2016;22(10):1781–91.
116. Berea-Baltierra R, Rivas-Ruiz R, Pérez-Rodríguez M, Palacios-Cruz L, Moreno J TJ. Clinical research XX. From clinical judgment to multiple logistic regression model. *Rev Med Inst Mex Seguro Social.* 2014;52(2):192–7.

117. Mifflin G, Russell NH, Franklin I, et al. An analysis of the effect of chronic GvHD on relapse and survival following allogeneic PBSC transplantation. *Cytotherapy*. 2000
118. Luis Espinoza J, Takami A, Yoshioka K, et al. Human microRNA-1245 down-regulates the NKG2D receptor in natural killer cells and impairs NKG2D-mediated functions. *Haematologica*. 2012;97(9):1295–303.
119. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, et al. 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.
120. Ruggeri L. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* (1979). 2002;295:2097–100.
121. Karimi MA, Bryson JL, Richman LP, et al. NKG2D expression by CD8+ T cells contributes to GVHD and GVT effects in a murine model of allogeneic HSCT. *Blood*. 2015;125(23):3655–63.
122. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*. 2003;102(4):1389–96.
123. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grünebach F, et al. Comprehensive Analysis of NKG2D Ligand Expression and Release in Leukemia: Implications for NKG2D-Mediated NK Cell Responses. *The Journal of Immunology*. 2012;189(3):1360–71.
124. Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419(6908):734–8.
125. Raneros AB, Fernandez AF, Rodriguez RM, et al. Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia. 2014;(March):1–12.
126. Baragaño Raneros A, López-Larrea C, Suárez-Álvarez B. Acute myeloid leukemia and NK cells: two warriors confront each other. *Oncoimmunology*. 2019;8(2):1–11.
127. Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature*. 2019;572(7768):254–9.
128. Caligiuri M a. Human natural killer cells. *Bone*. 2008;112(3):461–9.
129. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633–40.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Human Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Haplotype block 1 variant (HB-1v) of the NKG2 family of receptors

Wendy Guadalupe Vazquez-Gonzalez^a, Julio Cesar Martinez-Alvarez^b, Araceli Arrazola-Garcia^b, Martha Perez-Rodriguez^{a,*}

^a Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, CP 06720 Ciudad de México, Mexico

^b Banco Central de Sangre, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, CP 06720 Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
NKG2
Receptors
Frequency
Haplotype

ABSTRACT

The natural killer group 2 (NKG2) family of receptors, encoded within the NK complex gene region (NKC), modulate the cytotoxic activity of NK cells. Two haplotype blocks throughout the NKC, hb-1 and hb-2 have been associated with different levels of overall natural cytotoxicity. Here, we evaluated allelic and genotype frequencies at rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171, rs1983526 (hb-1 haplotype), and rs2255336 and rs2246809 (hb-2 haplotype) in 928 subjects examined from Mexico City. The most frequent alleles and genotypes were as follows: C, CG to rs1049174; G, GG to rs2255336; T, AT to rs2617160; G, GG to rs2246809; C, CT to rs2617170; G, CG to rs2617171; and G, CG to rs1983526. Linkage disequilibrium analysis revealed that rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171 constituted the haplotype block-1 variant (hb-1v) ($r^2 \geq 0.89$). Two predominant haplotypes of hb-1v were identified based on the allele content and included CTCG and GATC. This study is the first to evaluate the allelic and genotype frequency distribution of rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526 in the population of Mexico City.

1. Introduction

Natural Killer (NK) cells are lymphocytes of the innate immune system with cytotoxic activity and cytokine-producing function [1,2]. NK cells participate in immune surveillance and respond in the absence of prior stimulation against virus-infected cells and tumor cells [3,4]. NK cells discriminate between target cells and other healthy “self” cells through a balance of activating and inhibitory receptors that are expressed on their surfaces. Thus, NK activation relies on the integration of activating and inhibitory pathways following interaction with a target cell [5].

Natural killer group 2 (NKG2) is a family of receptors comprising five members (NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E and NKG2F). These receptors are type II transmembrane proteins with a C-type lectin-like extracellular domain and are expressed on NK cells. NKG2D receptor is also expressed on NKT cells, $\gamma\delta$ T cells, CD8⁺ T cells and a small subset of effector or memory CD4⁺ T cells [6–8]. Each receptor exhibits a different function. NKG2A is a unique inhibitory receptor of this family, whereas NKG2C and NKG2D are activating receptors [5]. It was recently reported that NKG2E may function as an intracellular protein, whereas the function of NKG2F receptor remains unclear [9–11]. The ligands of NKG2 receptors are different. NKG2A, NKG2C and NKG2E receptors bind to the nonclassical

major histocompatibility complex (MHC) protein HLA-E [12], which presents the peptides derived from the conserved region of the leader sequences of MHC class I molecules. The interaction between HLA-E and NKG2 receptors facilitates the function of NK cells to monitor the expression of MHC class I molecules on target cells and control the capacity to process and present antigen [5]. Although NKG2A and NKG2C receptors have a common ligand, both receptors transmit opposing signals via different intracellular domains [13]. NKG2A contains two immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) in its long cytoplasmic tail. In contrast, NKG2C has a short cytoplasmic tail with a lysine residue in the transmembrane domain that contributes to the association with an adapter molecule (DAP12), containing immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). The NKG2D receptor also has a short cytoplasmic tail that is associated with DAP10, which has a YINM motif essential for signaling [5,8,13]. The NKG2D receptor binds to the MHC class I chain-related like molecules A and B (MICA/B) and UL16-binding proteins (ULBPs). The expression of NKG2D ligands on target cells is frequently attributed to the cellular stress caused by events such as oncogenic transformation or viral infection [7,8,14,15].

The members of the family of NKG2 receptors are encoded by genes on human chromosome 12p13 within a region of approximately 2.5 Mb,

* Corresponding author at: Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría 3er Piso, CMN S-XXI, IMSS, Cuauhtémoc 330, Col Doctores, CP 06720 Ciudad de México, Mexico.

E-mail address: meperezrodriguez@yahoo.com.mx (M. Perez-Rodriguez).

<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.07.276>

Received 24 September 2018; Received in revised form 5 July 2019; Accepted 8 July 2019

Available online 15 July 2019

0198-8859/© 2019 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Table 1
Primers for SNP sequencing assays.

SNP	Chr 12: position	Gene	Genic Location	Primer sequence (5' → 3')	Product size (bp)
rs1049174	10372766	<i>KLRK1</i>	Exon 8	F: CACAAGCCCAGAGTGGATGG R: TTGGGTGGAGGACCCATTA	236
rs2255336	10379727	<i>KLRK1</i>	Exon 4	F: TCTAGGGATGACTGGGGAAC R: TGTGCAATCTACTCTCTGTGT	358
rs2617160	10392998	<i>KLRC4-KLRK1</i>	Intergenic	F: AGGAAGGTGGCCAGAGAAAA R: GCATCTATGGCCACACCACC	326
rs2246809	10404445	<i>KLRC4-KLRK1</i>	Intergenic	F: TGGAAATGATACATGTTTCTCTGC R: ACAACAGAAATCTGAGTAACTCT	405
rs2617170	10408358	<i>KLRC4</i>	Intron 2	F: TTGGAAGCGCCTTGAAACATT	689
rs2617171	10408680	<i>KLRC4</i>	Exon 3	R: AAAGGACATGCCCTCATATAATCT	
rs1983526	10455414	<i>KLRK1</i>	-729 bp	F: ACAGACCTTGAAGTGGACCC R: CATGATCCTTTACTAGGGCTTCT	125

SNP: single nucleotide polymorphism; Chr: chromosome; F: forward primer sequence; R: reverse primer sequence; bp: base pair.

termed as the natural killer complex (NKC). This cluster is flanked by *KLRD1* (CD94) gene on the telomeric side and *Ly49* gene on the centromeric side. From the telomeric to centromeric region, the NKG2 cluster of 270 kb comprises the following genes: *KLRK1* (NKG2D), *KLRC4* (NKG2F), *KLRK3* (NKG2E), *KLRC2* (NKG2C), and *KLRK1* (NKG2A) [6,16,17]. To investigate whether the differences between the individuals with respect to natural immunological host defense predict the future development of cancer, Imai *et al.* performed an 11-year follow-up study in a group of 3625 healthy individuals. These authors found that the individuals with low cytotoxic activity had a higher risk of developing cancer than those with high cytotoxic activity [18]. Furthermore, cytotoxic activity assays and polymorphism studies revealed the association of NK cell cytotoxic activity with seven single nucleotide polymorphisms (SNPs) located within the NKC gene region, including rs1049174 (*KLRK1*), rs2255336 (*KLRK1*), rs2617160 (*KLRC4-KLRK1*), rs2246809 (*KLRC4-KLRK1*), rs2617170 (*KLRC4*), rs2617171 (*KLRC4*) and rs1983526 (*KLRK1*) [18,19]. These SNPs are in linkage disequilibrium (LD) and generate two haplotype blocks. The haplotype block 1 (hb-1) is constructed from the telomere to the centromere by rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171 and rs1983526, whereas the haplotype block 2 (hb-2) is generated by rs2255336 and rs2246809. The two blocks were subsequently studied and classified in four major haplotype alleles, based on the cytotoxic activity of NK cells and the allele content. In this context, CTCC haplotype (LNK1, low activity) and GATGG haplotype (HNK1, high activity) were found to belong to hb-1. Both haplotypes are located in rs1049174, rs2617160, rs2617170, rs2617171, and rs1983526. The GG haplotype (LNK2, low activity) and AA haplotype (HNK2, high activity), on the other hand, were shown to belong to hb-2 and were located in rs2255336 and rs2246809, respectively [19,20]. To determine whether these SNPs can generate different haplotypes, we studied the allele and genotype frequency distributions of rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526 as well as haplotype generation through LD analysis.

2. Materials and methods

2.1. Study subjects

The seven SNPs of NKG2 were examined in a total of 928 unrelated healthy adults. The individuals were selected from blood donors of a general population that attended blood banks of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City. All included subjects were born and living in Mexico City for the last three generations, thereby avoiding variations in the admixture of the Mexican population according to the geographical area. All participants were over 30 years old, without any symptoms of disease, cancer history, genetic or autoimmune disease and treatment of antibiotics or medications. The individuals were informed about the nature of the study, and the participating individuals were asked to sign a consent letter. The study was

approved by the ethics committee from the National Council for Research on Health, IMSS, Mexico City.

2.2. DNA samples

A blood sample anti-coagulated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-K2 was drawn from each participant. The genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using the salting-out method [21].

2.3. Genotyping

The genotyping of rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526 was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using Allelic Discrimination TaqMan Assays Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Genotyping was performed according the instructions recommended by the manufacturer with the following available assays: C_9345347-10 (rs1049174), C_22274447-10 (rs2255336), C_1841959-10 (rs2617160), C_1842497-10 (rs2246809), C_1842316-10 (rs2617170), C_26984346-10 (rs2617171), and C_11919464-10 (rs1983526).

2.4. Sequencing

Samples with homozygous genotypes were subjected to direct sequencing using specific primers for each SNP (Table 1). PCR was performed in a final volume of 25 µL containing 125 ng of genomic DNA, 1.5 mM of magnesium chloride (MgCl₂), 0.5 pmol of each primer (IDT; San Jose, California, USA), 1 mM dNTPs, 1 × PCR buffer, and 0.1 U Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). The sequences of the forward and reverse primers used for each SNP are listed in Table 1. PCR was performed in a thermal-cycler Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). The PCR reaction conditions were as follows: an initial denaturation at 95 °C for 5 min was followed by 33 cycles at 95 °C for 30 s, annealing at 59 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s, with a final elongation cycle at 72 °C for 7 min. The annealing of rs1983526 was carried out at 61 °C. The PCR products were purified by ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) in accordance with the instructions recommended by the manufacturer. The purified PCR products were sequenced using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) according the instructions recommended by the manufacturer using Applied Biosystems 3730 × L DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA).

2.5. Statistical analysis

The median and interquartile range (IQR) were calculated to describe the age of individuals. The deviation from Hardy-Weinberg

equilibrium (HWE) in all SNPs studied was examined with a goodness-of-fit χ^2 test with Haploview software version 4.0 [22]. The allelic and genotype frequencies were estimated by direct counting, whereas the haplotype frequencies were performed using Haploview software. The allelic and genotype frequencies differences were analyzed using χ^2 test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. LD analysis was performed using Haploview software and haplotype generation was considered at $r^2 \geq 0.80$ [23].

3. Results

3.1. Characteristics of the population

The studied population comprised 53.8% women (499/928) and 46.2% men (429/928). The median age was 36 years, and the inter-quartile range was 29–45 years. The frequency distribution for NKG2 SNPs was in accordance with H-W equilibrium ($p > 0.05$).

3.2. Allele and genotype frequencies

The more frequent alleles of rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526 were C, G, T, G, C, G and G, respectively (Table 2). We compared these allele frequencies with the frequencies reported in other populations, such as those with Mexican ancestry from Los Angeles California, African, European, South Asian, and Japanese populations (Table 3) [19,24]. In our population, the frequencies of C (rs1049174), T (rs2617160), C (rs2617170), and G (rs2617171) alleles were lower than the previously reported frequencies for the subjects with Mexican ancestry from Los Angeles, California ($p < 0.05$). The frequencies of the SNPs rs2255336, rs2246809, and rs1983526 were similar in both populations [24]. In African population, the frequencies of C (rs1049174), G (rs2255336), T (rs2617160), G (rs2246809), C (rs2617170), and G (rs2617171) alleles were lower, and the frequency of G (rs1983526) allele was higher than the frequencies reported for the subjects from Mexico City ($p < 0.05$) [24]. In European population, C (rs1049174), T (rs2617160), G (rs2617171) and G (rs1983526) alleles were more frequent, and G (rs2255336) and G (rs2246809) alleles were

less frequent than in our population ($p < 0.05$) [24]. The frequency of C (rs2617170) was similar between European and Mexico City populations. In the South Asian population, C (rs1049174), T (rs2617160), G (rs2246809), C (rs2617170), and G (rs2617171) alleles were less frequent, and G (rs1983526) allele was more frequent than in the Mexico City population ($p < 0.05$) [24]. The frequency of G (rs2255336) was similar between South Asian and Mexico City populations. The allele frequency results were different in all SNPs studied as compared with the Japanese population [19]. The frequencies of six SNPs C (rs1049174), G (rs2255336), T (rs2617160), G (rs2246809), C (rs2617170), and G (rs2617171) alleles were lower and G (rs1983526) allele was higher in the Japanese population than in our population ($p < 0.05$) (Table 3). Of note, the most striking differences in allele and genotype distribution between Mexicans and Japanese were at rs2617171 (included in hb-1 haplotype block), rs2255336 and rs2246809 (hb-2 haplotype block) ($p < 0.0001$).

The results of our genotype analysis showed that the heterozygotes CG (rs1049174), AT (rs2617160), CT (rs2617170), CG (rs2617171), and CG (rs1983526) and the homozygotes GG (rs2255336) and GG (rs2246809) were the most frequent genotypes (Table 2). The genotype frequencies were compared between different populations [24] and the genotype distribution was found to be different in each population (Table 3).

3.3. Haplotype analysis

We performed LD analysis to determine whether the seven SNPs (rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526) could generate the previously reported hb-1 and hb-2 haplotypes [19]. The SNPs constituted a haplotype at $r^2 \geq 0.80$ between each pair. LD analysis revealed one haplotype formed by rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171 ($r^2 \geq 0.89$). However, rs1983526 showed no LD (≤ 0.51) with either of the SNPs studied; hence, rs1983526 was excluded from this haplotype, as it was reported for hb-1 haplotype [19]. In fact, rs1983526 failed to generate any haplotype. Thus, the haplotype generated was considered a variant and was named as haplotype block-1 variant (hb-1v) as per a previously reported nomenclature (Fig. 1) [19]. Regarding rs2255336 and rs2246809, the allele and genotype frequencies between both SNPs were similar (Table 2). However, the minor-allele frequencies for both of them were low (0.071 and 0.070, respectively). Of note, all individuals (4, 0.4%) who carry the rs2246809 AA genotype also carry the rs2255336 AA genotype. Though initial LD estimation showed low LD between each other ($r^2 = 0.78$) and no LD with any other SNP studied, r^2 is not appropriate for LD assessment when minor-allele frequencies are low. We thus calculated D' value and found strong LD ($D' = 0.89$) between these two SNPs.

3.4. Haplotypes from haplotype block-1 variant

We found two predominant haplotype alleles of hb-1v; the dominant CTCG and the recessive GATC (rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171, respectively in both haplotypes). Moreover, the LD ($r^2 \geq 0.89$) among CTCG and GATC was supported by sequencing. As was mentioned above, the hb-1v was considered a variant of hb-1, previously reported [19]. In this context, the difference between the haplotype alleles of hb-1v and hb-1 was based on differences in the genotype frequency distribution of rs2617171 between Japanese and Mexico City populations (Table 3) [19].

The CTCG haplotype showed a frequency of 0.610, whereas the GATC haplotype revealed a frequency of 0.356 (Table 4). The most frequent haplotype was heterozygote CTCG/GATC, followed by homozygote CTCG/CTCG and homozygote GATC/GATC (Table 4).

We studied the different combinations of these seven SNPs to determine the most frequent combination, although not all the SNPs were included in LD. The CGTGCGC alleles of rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526 were the most frequent (0.472), followed by the GGAGTCG alleles of the same SNPs (0.282).

Table 2
Allele and genotype frequencies in Mexico City population.

SNP	Chr 12: position	Allele	2n = 1856 AF (n)	Genotype	n = 928 GF (n)
rs1049174	10372766	C	0.628 (1166)	CC	0.390 (362)
		G	0.372 (690)	CG	0.476 (442)
rs2255336	10379727	G	0.929 (1724)	GG	0.863 (801)
		A	0.071 (132)	AG	0.131 (122)
				AA	0.005 (5)
rs2617160	10392998	T	0.634 (1176)	TT	0.391 (363)
		A	0.366 (680)	AT	0.485 (450)
rs2246809	10404445	G	0.930 (1727)	GG	0.865 (803)
		A	0.070 (129)	AG	0.130 (121)
				AA	0.004 (4)
rs2617170	10408358	C	0.627 (1164)	CC	0.380 (353)
		T	0.373 (692)	CT	0.494 (458)
rs2617171	10408680	G	0.623 (1156)	GG	0.376 (349)
		C	0.377 (700)	CG	0.494 (458)
				CC	0.130 (121)
rs1983526	10455414	G	0.505 (937)	GG	0.250 (232)
		C	0.495 (919)	CG	0.510 (473)
				CC	0.240 (223)

n: individuals; SNP: single nucleotide polymorphism; Chr: chromosome; AF: allele frequency; GF: Genotype frequency.

Table 3
Comparison with allele and genotype frequencies for other populations.

SNP	Allele Genotype	Population					
		Mexico City n = 928	Mexican ancestry ^a n = 64	African n = 661	European n = 503	South Asian n = 489	Japanese n = 408
		Frequency (n)					
rs1049174	C	0.628 (1166)	0.734 (94) [*]	0.246 (325) [*]	0.690 (694) [*]	0.553 (541) [*]	0.581 (474) [*]
	CC	0.390 (362)	0.562 (36) [*]	0.054 (36) [*]	0.501 (252) [*]	0.311 (152) [*]	0.348 (142)
	CG	0.476 (442)	0.344 (22) [*]	0.383 (253) [*]	0.378 (190) [*]	0.485 (237)	0.466 (190)
	GG	0.134 (124)	0.094 (6)	0.563 (372) [*]	0.121 (61)	0.204 (100) [*]	0.186 (76) [*]
rs2255336	G	0.929 (1724)	0.883 (113)	0.553 (731) [*]	0.817 (822) [*]	0.910 (890)	0.772 (630) [*]
	GG	0.863 (801)	0.781 (50)	0.315 (208) [*]	0.674 (339) [*]	0.830 (406)	0.603 (246) [*]
	AG	0.131 (122)	0.203 (13)	0.477 (315) [*]	0.286 (144) [*]	0.160 (78)	0.338 (138) [*]
	AA	0.005 (5)	0.016 (1)	0.209 (138) [*]	0.040 (20) [*]	0.010 (5)	0.059 (24) [*]
rs2617160	T	0.634 (1176)	0.734 (94) [*]	0.523 (692) [*]	0.689 (693) [*]	0.548 (536) [*]	0.569 (464) [*]
	TT	0.391 (363)	0.562 (36) [*]	0.272 (180) [*]	0.497 (250) [*]	0.303 (148) [*]	0.331 (135) [*]
	AT	0.485 (450)	0.344 (22) [*]	0.502 (332)	0.384 (193) [*]	0.491 (240)	0.475 (194)
	AA	0.124 (115)	0.094 (6)	0.225 (149) [*]	0.119 (60)	0.207 (101) [*]	0.194 (79) [*]
rs2246809	G	0.930 (1727)	0.891 (114)	0.737 (974) [*]	0.819 (824) [*]	0.908 (888) [*]	0.771 (629) [*]
	GG	0.865 (803)	0.797 (51)	0.551 (364) [*]	0.676 (340) [*]	0.826 (404) [*]	0.598 (244) [*]
	AG	0.130 (121)	0.188 (12)	0.372 (246) [*]	0.286 (144) [*]	0.164 (80)	0.346 (141) [*]
	AA	0.004 (4)	0.016 (1)	0.077 (51) [*]	0.038 (19) [*]	0.010 (5)	0.056 (23) [*]
rs2617170	C	0.627 (1164)	0.727 (93) [*]	0.433 (572) [*]	0.663 (667)	0.544 (532) [*]	0.562 (459) [*]
	CC	0.380 (353)	0.547 (35) [*]	0.174 (115) [*]	0.455 (229) [*]	0.303 (148) [*]	0.324 (132) [*]
	CT	0.494 (458)	0.359 (23) [*]	0.517 (342)	0.416 (209) [*]	0.483 (236)	0.478 (195)
	TT	0.126 (117)	0.094 (6)	0.309 (204) [*]	0.129 (65)	0.215 (105) [*]	0.198 (81) [*]
rs2617171	G	0.623 (1156)	0.719 (92) [*]	0.240 (317) [*]	0.663 (667) [*]	0.536 (524) [*]	0.436 (356) [*]
	GG	0.376 (349)	0.531 (34) [*]	0.067 (44) [*]	0.455 (229) [*]	0.294 (144) [*]	0.196 (80) [*]
	CG	0.494 (458)	0.375 (24)	0.346 (229) [*]	0.416 (209) [*]	0.483 (236)	0.480 (196)
	CC	0.130 (121)	0.094 (6)	0.587 (388) [*]	0.129 (65)	0.223 (109) [*]	0.324 (132) [*]
rs1983526	G	0.505 (937)	0.492 (63)	0.859 (1135) [*]	0.588 (592) [*]	0.597 (584) [*]	0.550 (449) [*]
	GG	0.250 (232)	0.250 (16)	0.735 (486) [*]	0.376 (189) [*]	0.362 (177) [*]	0.306 (125) [*]
	CG	0.510 (473)	0.484 (31)	0.247 (163) [*]	0.425 (214) [*]	0.470 (230)	0.488 (199)
	CC	0.240 (223)	0.266 (17)	0.018 (12) [*]	0.199 (100)	0.168 (82) [*]	0.206 (84)

SNP: single nucleotide polymorphism; n: individuals.

Comparisons were made using the allele and/or genotype frequencies in Mexico City population as the reference group, *p ≤ 0.05.

^a Mexican ancestry from Los Angeles California USA population.

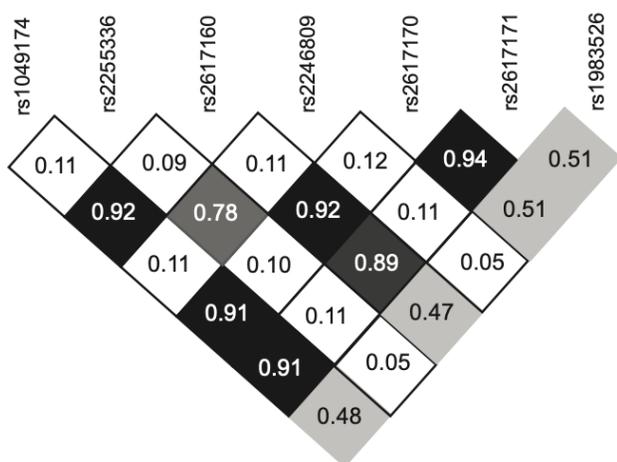


Fig. 1. Identification of haplotype block-1 variant (hb-1v). Genotyping data were linkage disequilibrium analyzed using Haploview 4.0 software. The haplotype generation was considered when $r^2 > 0.80$. In the linkage disequilibrium plot, the value inside of each row represents r^2 value and the color of each row depends on the r^2 value. The black elements indicate that SNPs in the intersection showed $r^2 > 0.80$, dark gray elements $r^2 < 0.80$ and > 0.60 , gray elements $r^2 < 0.60$ and > 0.40 , light gray elements $r^2 < 0.40$ and > 0.20 and white elements $r^2 < 0.20$.

Table 4
Haplotype block-1 variant (hb-1v) frequencies.

Haplotype ^a	n = 928 Frequency (n)
CTCG	0.610 (1132)
GATC	0.356 (661)
CTCG/CTCG	0.364 (338)
CTCG/GATC	0.460 (427)
GATC/GATC	0.114 (106)

n: individuals.

^a The order of the SNPs in the haplotypes is according to the positions in the chromosome (rs1049174 C/G, rs2617160 A/T, rs2617170 C/T and rs2617171 C/G).

4. Discussion

The distribution of the allele, genotype, and haplotype frequencies of rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526 in Mexico City was unknown. These variants have been associated with the cytotoxic activities of NK cells and CD8+ T lymphocytes [19,20,25]. Therefore, we characterized the previously identified SNP frequencies. Nevertheless, it is well established that hb-1v, based on LD analysis. The new haplotype comprised rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171.

The SNP frequencies of our population were compared with those of the Mexican population living in Los Angeles, California, USA [24].

Although both populations have the same ancestry, the frequency of SNPs was different between the two groups. While the alleles C (rs1049174), T (rs2617160), C (rs2617170), and G (rs2617171) were less frequent in our population, the frequency of other SNPs was similar. This difference could be attributed to the fact that the Mexican population of Los Angeles originated from different places in the country, whereas the samples studied in the present study were obtained from the same site. The admixture of the Mexican population varies according to the geographical area. Thus, it may be observed that the European ancestry predominates in the north and west of Mexico (66.7–95%), whereas the center and southeast are dominated by the Amerindian ancestry (37–50%) [26]. Mexico City population includes 69.2% of Amerindian genes, 30.2% of European genes, and 0.6% of African genes [27]. We could not compare the allele and genotype frequencies of our population with Mexican Amerindian population because no genotyping data are available for the SNPs studied in the database of Human Genome Diversity Project [28]. Regarding African, European, and South Asian populations, the allele frequencies were totally different from those studied in the present study [24]. We also compared the allele frequencies with the Japanese population because these SNPs were studied for the first time in this population [19]. As expected, the frequencies were different and statistically significant. The frequencies of the six SNPs in our population were higher than those in the Japanese population, whereas the frequency of G (rs1983526) allele was low. Genotype analysis results revealed CG (rs1049174), GG (rs2255336), AT (rs2617160), GG (rs2246809), CT (rs2617170), CG (rs2617171), and CG (rs1983526) as the most frequent genotypes in our population. However, the comparison of our results with the Mexican ancestry from Los Angeles California, African, European, South Asian, and Japanese populations revealed the differences in the genotype frequency distribution in each population [19,24]. This frequency distribution diversity within and between populations are governed by random (genetic drift) and deterministic (natural selection) forces [29,30].

Genotyping of all the SNPs in the human genome may be an expensive and unnecessary process, given the existence of LD among thousands of SNPs. LD refers to the nonindependence of alleles at different sites; thus, the alleles implied construct a haplotype [23]. The SNPs studied in the present report showed LD and allowed for the generation of an haplotype [19]. However, NKG2 haplotype generation has never been analyzed in our population; thus, LD analysis of the studied SNPs was performed to determine their nonrandom association. LD analysis results revealed some interesting observations. We found that rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171 are in LD because they showed r^2 values ≥ 0.80 and consequently constituted a haplotype. This haplotype was named as hb-1v because rs1983526 was not present in this haplotype unlike the observation reported for hb-1 in Japanese population [19]. In accordance with our results, rs1983526 showed no LD with the SNPs mentioned above in the Mexican ancestry from Los Angeles, California population [24]. Therefore, the hb-1v is restricted to *KLRC4-KLRK1* region (rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171). The SNPs rs2255336 and rs2246809 presented similar frequencies in our population, and a weak LD ($r^2 = 0.78$) was observed. However, as the r^2 value between these SNPs did not exceed the given threshold (0.80) we estimated the D' (0.89) value. Therefore, the value of r^2 between these SNPs may not necessarily indicate the lack of LD for these markers but more likely reflects the low power to detect LD [31,32]. It has been reported that LD differences between populations are the result of historical events [33]. In fact, a single mutation event may give rise to a mutated allele in a specific population, and this allele may have spread and changed in frequency over time owing to some evolutionary events such as admixture, genetic drift, mutation, migration, recombination rate, and natural selection. These events have resulted in specific patterns of LD for each population [34–36].

The comparison between hb-1v and hb-1 haplotypes revealed some interesting observations. For hb-1v, two predominant haplotypes were identified based on the allele content. The most common haplotype was

CTCG, followed by GATC haplotype (rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171 in both haplotypes). The allele of the fourth SNP (rs2617171) was different between major hb-1v haplotype allele (CTCG) and LNK1 for hb-1 (CTCC). Interestingly however, the frequencies of these haplotype alleles in Mexicans and Japanese were very similar (0.610 and 0.615, respectively) [19]. A fragment of *KLRC4* gene from intron 2 to intron 3 was thus sequenced, and included rs2617170 (exon 3) and rs2617171 (intron 2). Based on our results, we corroborate that G allele (rs2617171) generated CTCG haplotype and that C allele (rs2617171) generated GATC haplotype in Mexicans. This difference between major hb-1v haplotype allele and LNK1 variant of hb-1, associated with low overall NK cell and CD8 T lymphocytes cytotoxic activity, suggests a minor role for rs2617171 as tag SNP [19].

Although different SNPs are present within NKC, we decided to study the allele, genotype, and haplotype frequency distribution of only seven SNPs (rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526) owing to their association with the cytotoxic functions of NK and T CD8+ cells [19,20,25]. The existence of LD among SNPs may allow for the selection of a tag SNP to represent the remaining SNPs [23,37]. In this context, rs1049174 has been characterized as a tag SNP to hb-1 haplotype [25,38]. The SNP rs1049174 is located in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of *KLRK1* gene, which is a targeting site for the microRNA (miR-1245) negative regulator of NKG2D receptor expression [25]. NKG2D is an activating and co-stimulatory receptor expressed on NK and CD8 T lymphocytes [7]. The interaction between this activating receptor and its ligands (MICA, MICB, and ULBPs) mediates killing through the perforin cytotoxic pathway [8]. Although the hb-1 haplotype includes rs1983526, which is located within the promoter region of the *KLRC1* (NKG2A) gene, remains unclear whether this SNP participates in the regulation of NKG2A expression. Even, the hb-1 haplotype has been related to the cytotoxic function of NK and CD8 T lymphocytes due to regulation of NKG2D receptor expression [19,20,25]. The fact that hb-1v haplotype is restricted to *KLRC4-KLRK1* region further supports an hypothesis in which the relationship between these haplotypes and lymphocyte cytotoxicity involves NKG2D and not NKG2A regulation. Rs1049174 genotype has been related to some pathologic conditions, including recurrent miscarriage, cervical and colorectal cancer, as well as to improvement in response of some drugs [19,25,38–42]. Moreover, several other studies related rs2617170 genotype to the clinical course of Behcet's disease and chronic hepatitis B infection [43–45]. Our results further confirm the usefulness of rs1049174 or rs2617170 as alternative tag SNPs that could be used for future genetic association studies of human diseases. In addition, rs2255336 GG genotype has been related to the development of cervical cancer, systemic lupus erythematosus and to inefficient response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis [42,46,47]. The high frequency of this genotype in Mexico City Mexicans offers future opportunities for disease association studies in this population.

In conclusion, our study is the first approach to describe the allele, genotype, and haplotype frequencies of rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617170, rs2617171, and rs1983526 in Mexico City. The present study demonstrates that rs1049174, rs2617160, rs2617170, and rs2617171 constitute hb-1v and provides the basis for future association studies.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest in this work.

Acknowledgements

The study was supported by Coordinación Nacional de Investigación en Salud, IMSS, México, grants FIS/IMSS/PROT/G14/1322, FIS/IMSS/PROT/MD17/1689 and CONACYT SALUD-2014-1-233422. Wendy Guadalupe Vázquez González is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de

México (UNAM) and was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 440851 and IMSS 051-2012.

References

- [1] M.A. Caligiuri, Human natural killer cells, *Blood* 112 (2008) 461–469, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>.
- [2] E. Vivier, D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, et al., Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells, *Science* 331 (2011) 44–49, <https://doi.org/10.1126/science.1198687>.
- [3] B. Becknell, M.A. Caligiuri, Natural killer cells in innate immunity and cancer, *J. Immunother.* 31 (2008) 685–692, <https://doi.org/10.1097/CJ.0b013e318182de23>.
- [4] M. López-Bolet, A. Muntasell, C. Vilches, The CD94/NKG2C+ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection, *Semin. Immunol.* 26 (2014) 145–151, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.03.002>.
- [5] L. Martinet, M.J. Smyth, Balancing natural killer cell activation through paired receptors, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 243–254, <https://doi.org/10.1038/nri3799>.
- [6] F. Borrego, J. Kabat, D.-K. Kim, L. Lieto, K. Maasho, J. Pena, et al., Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells, *Mol. Immunol.* 38 (2002) 637–660, [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00107-9](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00107-9).
- [7] F.M. Wensveen, V. Jelenčić, B. Polić, NKG2D: a master regulator of immune cell responsiveness, *Front. Immunol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00441>.
- [8] A. Zingoni, R. Molfetta, C. Fionda, A. Soriani, R. Paolini, M. Cippitelli, et al., NKG2D and its ligands: “One for all, all for one”, *Front. Immunol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00476>.
- [9] H. Huang, X. Wang, Y. Zhang, X. Zheng, H. Wei, R. Sun, Up-regulation of NKG2F receptor, a functionally unknown killer receptor, of human natural killer cells by interleukin-2 and interleukin-15, *Oncol. Rep.* 4 (2010) 1043–1048, <https://doi.org/10.3892/or.00000953>.
- [10] D.K. Kim, J. Kabat, F. Borrego, T.B. Sanni, C.H. You, J.E. Coligan, Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12, *Mol. Immunol.* 41 (2004) 53–62, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.01.004>.
- [11] G.A. Orbelyan, F. Tang, B. Sally, J. Solus, B. Meresse, C. Ciszewski, et al., Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12, *J. Immunol.* 193 (2014) 610–616, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400556>.
- [12] V.M. Braud, D.S.J. Allan, C.A. O’Callaghan, K. Soderstrom, A. D’Andrea, G.S. Ogg, et al., HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C, *Nature* 391 (1998) 795–799, <https://doi.org/10.1038/35869>.
- [13] F. Borrego, M. Masilamani, A.I. Marusina, X. Tang, J.E. Coligan, The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance, *Immunol. Res.* 35 (2006) 263–277, <https://doi.org/10.1385/IR.35:3:263>.
- [14] R.A. Eagle, J. Trowsdale, Promiscuity and the single receptor: NKG2D, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 737–744, <https://doi.org/10.1038/nri2144>.
- [15] L.L. Lanier, NKG2D receptor and its ligands in host defense, *Cancer Immunol. Res.* 3 (2015) 575–582, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CCR-15-0098>.
- [16] J. Glienke, Y. Sobanov, C. Brostjan, C. Steffens, C. Nguyen, H. Lehrach, et al., The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex, *Immunogenetics* 48 (1998) 163–173, <https://doi.org/10.1007/s002510050420>.
- [17] W.M. Yokoyama, B.F.M. Plougastel, Immune functions encoded by the natural killer gene complex, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 304–316, <https://doi.org/10.1038/nri1055>.
- [18] K. Imai, S. Matsuyama, S. Miyake, K. Suga, K. Nakachi, Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population, *Lancet* 356 (2000) 1795–1799, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03231-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03231-1).
- [19] T. Hayashi, K. Imai, Y. Morishita, I. Hayashi, Y. Kusunoki, K. Nakachi, Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance, *Cancer Res.* 66 (2006) 563–570, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2776>.
- [20] K. Imai, T. Hayashi, M. Yamaoka, J. Kajimura, K. Yoshida, Y. Kusunoki, et al., 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, *Hum. Immunol.* 73 (2012) 686–691, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.03.003>.
- [21] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1215, <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>.
- [22] J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller, M.J. Daly, Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, *Bioinformatics* 21 (2005) 263–265, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>.
- [23] B. Liao, X. Wang, W. Zhu, X. Li, L. Cai, H. Chen, New multilocus linkage disequilibrium measure for tag SNP selection, *J. Bioinform. Comput. Biol.* 15 (2017) 1–16, <https://doi.org/10.1142/S0219720017500019>.
- [24] A. Auton, G.R. Abecasis, D.M. Altshuler, R.M. Durbin, D.R. Bentley, A. Chakravarti, et al., A global reference for human genetic variation, *Nature* 526 (2015) 68–74, <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
- [25] J.L. Espinoza, V.H. Nguyen, H. Ichimura, T.T. Pham, C.H. Nguyen, T.V. Pham, et al., A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to human papilloma virus-related cancers, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–12, <https://doi.org/10.1038/srep39231>.
- [26] G. Martínez-Cortés, J. Salazar-Flores, L.G. Fernández-Rodríguez, R. Rubi-Castellanos, C. Rodríguez-Loya, J.S. Velarde-Félix, et al., Admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on paternal lineages, *J. Hum. Genet.* 9 (2012) 568–574, <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.67>.
- [27] J.A. Aguilar-Velázquez, G. Martínez-Cortés, A. Inclán-Sánchez, A.F. Favela-Mendoza, J.S. Velarde-Félix, H. Rangel-Villalobos, Forensic parameters and admixture in Mestizos from five geographic regions of Mexico based on 20 autosomal STRs (Powerplex 21 system), *Int. J. Legal Med.* 132 (2018) 1293–1296, <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1810-z>.
- [28] J.Z. Li, D.M. Absher, H. Tang, A.M. Southwick, A.M. Casto, S. Ramachandran, et al., Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation, *Science* 319 (2008) 1100–1104, <https://doi.org/10.1126/science.1153717>.
- [29] L.B. Barreiro, G. Laval, H. Quach, E. Patin, L. Quintana-Murci, Natural selection has driven population differentiation in modern humans, *Nat. Genet.* 40 (2008) 340–345, <https://doi.org/10.1038/ng.78>.
- [30] W. Fu, J.M. Akey, Selection and adaptation in the human genome, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14 (2013) 467–489, <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153509>.
- [31] G.R. Abecasis, D. Ghosh, T.E. Nichols, Linkage disequilibrium: ancient history drives the new genetics, *Hum. Hered.* 59 (2005) 118–124, <https://doi.org/10.1159/000085226>.
- [32] J.K. Pritchard, M. Przeworski, Linkage disequilibrium in humans: models and data, *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001) 1–14, <https://doi.org/10.1086/321275>.
- [33] K.A. Goddard, P.J. Hopkins, J.M. Hall, J.S. Witte, Linkage disequilibrium and allele-frequency distributions for 114 single-nucleotide polymorphisms in five populations, *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 216–234, <https://doi.org/10.1086/302727>.
- [34] M.A. Eberle, M.J. Rieder, L. Kruglyak, D.A. Nickerson, Allele frequency matching between SNPs reveals an excess of linkage disequilibrium in genetic regions of the human genome, *PLoS Genet.* 2 (2006) 1319–1327, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020142>.
- [35] J.A. Sved, A.F. McRae, P.M. Visscher, Divergence between human populations estimated from linkage disequilibrium, *Am. J. Hum. Genet.* 83 (2008) 737–743, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.019>.
- [36] N. Wang, J.M. Akey, K. Zhang, R. Chakraborty, L. Jin, Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation, *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 1227–1234, <https://doi.org/10.1086/344398>.
- [37] S.B. Gabriel, S.F. Schaffner, H. Nguyen, J.M. Moore, J. Roy, B. Blumenstiel, et al., The structure of haplotype blocks in the human genome, *Science* 296 (2002) 2225–2229, <https://doi.org/10.1126/science.1069424>.
- [38] H. Furue, K. Matsuo, H. Kumimoto, A. Hiraki, T. Suzuki, Y. Yatabe, et al., Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese, *Carcinogenesis* 29 (2008) 316–320, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm216>.
- [39] S. Hizen, N. Mtraoui, S. Massaoudi, C. Fortier, W. Boukouaci, A. Kahina, et al., Polymorphisms in genes coding for the NK-cell receptor NKG2D and its ligand MICA in recurrent miscarriage, *Am. J. Reprod. Immunol.* 72 (2014) 577–585, <https://doi.org/10.1111/aji.12314>.
- [40] A. Roszak, M. Lianeri, P.P. Jagodziński, Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with cervical carcinoma, *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 16 (2012) 841–845, <https://doi.org/10.1089/gtmb.2011.0308>.
- [41] A. Asadi-Saghandi, A. Shams, G. Eslami, S.A. Mirghanizadeh, E. Eskandari-Nasab, Peginterferon Alfa-2a/Ribavirin treatment efficacy in chronic hepatitis C patients is related to natural killer group 2D gene rs1049174 GC polymorphism, *Virus Disease* 27 (2016) 369–374, <https://doi.org/10.1007/s13337-016-0349-1>.
- [42] M. Iwaszko, J. Świerkot, K. Kolossa, S. Jeka, P. Wiland, K. Bogunia-Kubik, Influence of NKG2D genetic variants on response to anti-TNF agents in patients with rheumatoid arthritis, *Genes (Basel)* 9 (2018) 1–15, <https://doi.org/10.3390/genes9020064>.
- [43] Y. Yang, H. Tan, B. Deng, H. Yu, G. Su, J. Hu, et al., Genetic polymorphisms of C-type lectin receptors in Behcet’s disease in a Chinese Han population, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05877-x>.
- [44] I. Sousa, F. Shahram, D. Francisco, F. Davatchi, B.S. Abdollahi, F. Ghaderibarmi, et al., Brief report: association of CCR1, IL12A, IL12A-AS1, STAT4, and ERAP1 with Behcet’s disease in Iranians, *Arthritis Rheumatol.* 67 (2015) 2742–2748, <https://doi.org/10.1002/art.39240>.
- [45] J. Ma, X. Guo, X. Wu, J. Li, X. Zhu, Z. Li, et al., Association of NKG2D genetic polymorphism with susceptibility to chronic hepatitis B in a Han Chinese population, *J. Med. Virol.* 82 (2010) 1501–1507, <https://doi.org/10.1002/jmv.21855>.
- [46] P. Piotrowski, M. Lianeri, M. Olesińska, P.P. Jagodziński, Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus, *Mol. Biol. Rep.* 39 (2012) 1343–1347, <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0868-1>.
- [47] G. Kabalak, R.M. Thomas, J. Martin, N. Ortego-Centeno, J. Jimenez-Alonso, E. de Ramón, et al., Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 74–78, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.09.352>.