

11236



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"

ASOCIACION DE LOS GENES HLA-CLASE II
CON POLIPOSIS NASAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LA ESPECIALIDAD EN
OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE
CABEZA Y CUELLO

P R E S E N T A:

DR. J. JESUS SOLORIO ABREU



ASESOR DE TESIS:

DR. GERMAN E. FAJARDO DOLCI

MEXICO, D. F.

~~2004~~
2005

0350665



Universidad Nacional
Autónoma de México




UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

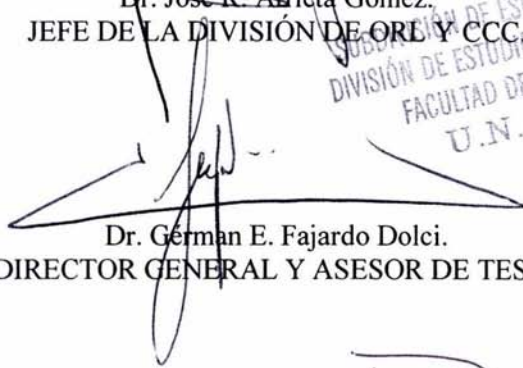
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

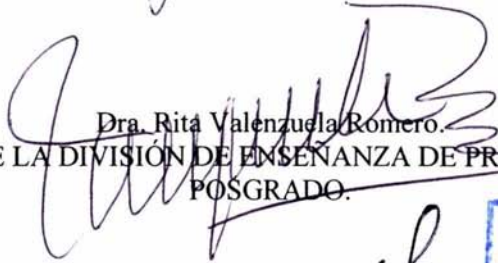
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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


AUTORIZACIONES.


Dr. José R. Arrieta Gómez,
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ORL Y CCC



SUBDIRECCIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.


Dr. German E. Fajardo Dolci,
DIRECTOR GENERAL Y ASESOR DE TESIS.


Dra. Rita Valenzuela Romero,
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA DE PREGRADO Y
POSGRADO.


Dr. Francisco Javier Rodríguez Suárez,
DIRECTOR DE ENSEÑANZA.

HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"
DIRECCION DE ENSEÑANZA


Dra. Ana Flisser Steinbruch,
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN.

*A Dios,
por haber puesto en mi camino
a la mejor familia, novia, maestros y compañeros,
todos han sido un ejemplo y motivación.*

**Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

ASOCIACIÓN DE LOS GENES HLA-CLASE II CON POLIPOSIS NASAL

INVESTIGADORES:

Investigadores Responsables: Dr. Germán E. Fajardo Dolci, Director General y Dr. José R. Arrieta Gómez, Jefe del servicio de ORL y CCC.

Investigador Principal: Dr. J. Jesús Solorio Abreu, R4 de Otorrinolaringología y CCC.

Investigador asociado: Dra. Angélica Olivo Díaz, Jefa del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.

Investigador asociado: Tec. Víctor Martínez Vilchis, Técnico A adscrito al Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.

Investigador asociado: Tec. Rocío Jiménez Lucio, Técnico A adscrito al Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.

SEDES.

Dirección General.

Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad

ANTECEDENTES.

La poliposis nasal es una enfermedad inflamatoria de la mucosa de la nariz y los senos paranasales. La formación de pólipos es parte de un complejo fenómeno manifestado por edema de la mucosa. Los pólipos se originan en la encrucijada anatómica de la pared lateral nasal en el meato medio y el etmoides, hueso impar que pertenece a la base del cráneo y el macizo facial. En su evolución la poliposis podrá afectar a los senos maxilares, frontales y al esfenoides. La prevalencia de la poliposis nasal es del 2 al 5 % de la población general, con una incidencia elevada en individuos mayores de 30 años (1) y es excepcional en los menores de 10 años, debiéndose pensar a esta edad en una fibrosis quística. En un estudio endoscópico postmortem de 69 pacientes, los cuales habían fallecido por enfermedad cardiopulmonar y enfermedades malignas, se encontró que 22 individuos presentaban pólipos (32%) (2). La poliposis puede asociarse o ser una manifestación concomitante de otras enfermedades de la nariz, de los senos paranasales o enfermedades sistémicas. Con más frecuencia de la esperada en la población general se asocia al asma (3). Cuando además de asma existe intolerancia al ácido acetil salicílico (AAS) se conoce como tríada de Widal o de Samter (4, 5). Respecto a la etiología de los pólipos nasales aún existe discusión. Se han citado sobre todo la alergia, aunque estudios recientes como el realizado por Gabor en Hungría, señalan que la alergia no es una condicionante para la formación de los pólipos (6). Se han reportado la presencia de hongos saprofitos (7, 8, 9), una base genética debido a una discreta agregación familiar (10, 11), factores adicionales como la contaminación ambiental, alteraciones del flujo aerodinámico del aire, disfunción del sistema nervioso autónomo, infecciones crónicas, alteraciones ciliares de las células de la mucosa nasal, alteración del metabolismo y la homeostasis celular y factores de edema local en la etiología de los mismos. Los conocimientos actuales apoyan la hipótesis de una patogenia multifactorial en la que los pólipos se originan a partir de una base inflamatoria crónica persistente condicionada por un microambiente local. La base fisiopatológica se encuentra en la inflamación difusa de la mucosa de las fosas nasales y senos paranasales. Los pólipos nasales contienen una gran cantidad de células inflamatorias, sobre todo eosinófilos y mastocitos. Estas células, además de las células estructurales, como fibroblastos y células epiteliales, liberan moléculas que actúan como mediadores inflamatorios. Entre los mediadores inflamatorios destaca: la histamina, un gran número de citocinas, quimiocinas, factores de transcripción y eicosanoides (11, 12). La presencia de eosinófilos activados por muchos de estos mediadores inflamatorios, es una de las características más destacadas y parece ser la responsable principal de la inflamación crónica persistente en la poliposis nasal. Se ha sugerido también un papel importante de la ciclooxigenasa (Cox), enzima responsable de sintetizar diversas prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA).

Los síntomas de inicio suelen ser la obstrucción nasal progresiva (97%), rinorrea anterior y posterior (69%), cefalea (43%) e hiposmia (17%). A la exploración se observa una lesión única o múltiple, uni o bilateral, redondeada, de superficie lisa, brillante, pediculada, que proviene principalmente del ático nasal o meato medio.

En los adultos la asociación de obstrucción nasal bilateral, hiposmia o anosmia, junto a la visualización de los pólipos mediante la exploración otorrinolaringológica, suelen ser suficientes para el diagnóstico. Es útil realizar una evaluación estricta de alergia para descartar factores agravantes, así como una tomografía computarizada (TC) para evaluar la extensión sinusal de la enfermedad. Friedman y col. (13) publicaron un sistema de estadificación clínica en base a estudios de tomografía computada. El estadio I se define como una enfermedad de foco único; este es ordinariamente un estadio agudo y usualmente responde bien a la medicación. El estadio II es una enfermedad multifocal que responde a tratamiento conservador. El estadio III es un paciente con pólipos nasales difusos, enfermedad hiperplásica de todas o la mayoría de las celdillas etmoidales, senos maxilares, esfenoidales o frontales, que mejora clínicamente con tratamiento conservador, aún cuando la enfermedad radiográficamente persiste. El estadio IV, es el paciente en estadio III, sin respuesta clínica a tratamiento conservador y que lo hace candidato a cirugía. El tratamiento de elección en la poliposis nasal son los corticoides, tanto sistémicos como tópicos intranasales. El uso de corticoides intranasales tras la cirugía, reduce

también las recurrencias. Recientemente como terapia adyuvante se han utilizado los anti-leucotrienos, particularmente el montelukast y zafirlukast, los cuales inhiben la unión de los leucotrienos a los receptores CysLT1. Los leucotrienos son mediadores inflamatorios producidos por diversas células como los mastocitos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y monocitos. El efecto de estos mediadores es importante en la patogenia de entidades como el asma, rinitis alérgica y probablemente en la formación de los pólipos (13).

En cuanto al tratamiento quirúrgico, en la actualidad se realiza principalmente por vía endoscópica, aunque puede combinarse con abordajes externos tipo Caldwell-Luc. La cirugía está indicada cuando el tratamiento médico falla en controlar la sintomatología, cuando existe la enfermedad en pacientes que no son candidatos al manejo con esteroides sistémicos, en caso de infección persistente o complicaciones de enfermedad sinusal como mucocoeles y si hay obstrucción nasal total. La inmunoterapia se ha empleado sobre todo después de la polipectomía, para evitar o reducir las recidivas.

En el diagnóstico diferencial se debe incluir a los encefalocelos, meningocelos, papilomas invertidos, carcinoma de células escamosas, sarcomas, angiofibromas y cordomas. Si los pólipos se presentan principalmente en el ático nasal, hay que descartar la presencia de un esteseoneuroblastoma.

Desde el punto de vista anatómico patológico, el cuerpo del pólipo es un estroma marcadamente edematoso, con un infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario de intensidad variable, con predominio de eosinófilos. La inflamación es dispersa y suele ser prominente alrededor de las glándulas mucoproducidas las cuales muestran un aumento de la actividad secretoria. La mucosa que cubre el pólipo suele ser un epitelio columnar ciliado, ocasionalmente con metaplasia escamosa. Histológicamente se ha hecho una distinción entre pólipos inflamatorios agudos y crónicos. Los primeros presentan una superficie mucosa con muchas células calciformes, una membrana basal eosinofílica engrosada, un estroma mixomatoso con un infiltrado inflamatorio que varía desde predominantemente neutrofílico, a prácticamente todo eosinófilo. En la enfermedad crónica, la mucosa puede revelar un cierto grado de metaplasia escamosa, mientras que el estroma es usualmente fibroso con estructuras vasculares dispersas.

Diferentes publicaciones hacen referencia a la asociación familiar, destacando los estudios de gemelos idénticos que desarrollan pólipos a la misma edad aún sin vivir juntos (10), o en otros casos, uno desarrolla pólipos y el otro asma (11). Según esta sospecha genética la poliposis nasal es una enfermedad poligénica en la que hay evidencia de la participación de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (14, 15).

Debido a que los HLA-DR (que son antígenos de clase II del complejo principal de histocompatibilidad en el humano y son codificados en el brazo corto del cromosoma 6) se expresan en la superficie de las células inflamatorias de los senos paranasales y pólipos, se han realizado estudios sobre los alelos de los genes clase II, sin detectar una asociación entre la poliposis nasal simple (no asociada a otras entidades), con los alelos de los genes HLA-DRB1, -DQA1 y -DQB1; aunque sí se encontró una mayor frecuencia del haplotipo HLADR7 (14).

En un estudio realizado en el año 2000 en Austria, Luxemberger y col. mediante serología observaron una asociación significativa entre el HLA-A74 y poliposis nasal (16).

El MHC en el humano se conoce como Complejo HLA (del inglés: Human Leucocyte Antigens). Se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y abarca aproximadamente 4,000 Kb. Se han descrito alrededor de 50 genes HLA. Este complejo genético induce y regula a la respuesta inmunológica y discrimina lo propio de lo extraño (17, 18). Incluye regiones que codifican para los antígenos de superficie HLA-clase I y -clase II que presentan antígenos a las células T CD8+ y CD4+, respectivamente.

Las moléculas MHC clase I son glicoproteínas de membrana presentes en casi todas las células nucleadas. Están formadas por una glicoproteína de 45 KDa llamada cadena pesada o α unida no covalentemente a la β_2 -microglobulina (β_2 -m), que es la cadena ligera de 12 KDa. La cadena α tiene 3 dominios: α -1, α -2 y α -3, una región transmembranal TM y una región citoplásmica CY. La región de unión al péptido se encuentra en los dominios α -1 y α -2, que forman la porción superior de la molécula clase I, donde radica todo el polimorfismo. El dominio α -3 y la β_2 -m forman parte de la porción extracelular de la molécula y tienen una estructura muy similar a la de la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (17, 18).

La región de clase I está formada por 17 genes, de los cuales sólo se transcriben 6 productos, los demás son pseudogenes. Codifica para los antígenos clásicos HLA-A, -B y -C, que se llaman así por el papel central que juegan en la unión y presentación de péptidos a las células T CD8+, son muy polimórficos y se encuentran ampliamente distribuidos sobre las membranas de todas las células nucleadas, con excepción de los eritrocitos y los espermatozoides. Su densidad es particularmente elevada en los linfocitos T y B. Existen otros genes clase I no clásicos que gobiernan la síntesis de antígenos de diferenciación: la molécula HLA-G se expresa sobre membranas del trofoblasto y en la interfase materno-fetal. Las HLA-E y -F son intracelulares. Los genes clase I no clásicos difieren de los clásicos en que no son polimórficos y se expresan en el período embrionario interviniendo en la maduración y en el mantenimiento intrauterino del feto. Los genes HLA-X y -H se transcriben pero no son funcionales (17, 18).

La cristalografía de las moléculas clase I permitió un mejor entendimiento de su función (19). Inmediatamente se reconoció la importancia del sitio de unión al péptido, localizado en los dominios α -1 y α -2, así como su significado en la interacción con el TCR. Los péptidos que se unen a las moléculas clase I se generan por degradación del antígeno en el citosol de la célula presentadora de antígeno (CPA) por la vía proteolítica, mediada por los proteasomas. Estos son complejos proteicos multicatenarios que contienen 15 a 20 subunidades. Hay dos subgrupos de proteasomas, denominados LMP1 y LMP7, codificados en la región de clase II y cuya función es generar péptidos de un tamaño y especificidad adecuados para asociarse con las moléculas clase I. Estos péptidos son transportados al retículo endoplásmico, mediante transportadores de péptidos antigénicos (TAP), que son heterodímeros codificados por los genes TAP1 y TAP2, también ubicados en clase II. Dentro del retículo endoplásmico, los TAP se asocian con la cadena α de la molécula clase I que ya se encuentra unida a la β_2 m (20). Se requiere de la molécula completa para unir al péptido y para darle estabilidad. La asociación se lleva a cabo por una proteína residente en el retículo endoplásmico llamada calnexina, que se disocia una vez que el complejo se ha formado. En este momento se une a TAP y recibe al péptido para formar el complejo clase I-péptido que se exporta eficientemente a la superficie de las células. La molécula clase I que no se carga con un péptido se dirige a un subcompartimiento del retículo endoplásmico para su degradación. La mayoría de los péptidos que se unen a clase I derivan de las proteínas endógenas y son de 8 a 10 residuos de aminoácidos. Los extremos amino y carboxilo del péptido se insertan dentro del nicho formado por los dominios polimórficos. Una vez que se forma el complejo clase I-péptido, es presentado al TCR del precursor de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) que inducen la expresión del receptor de IL-2 del linfocito T para su proliferación y diferenciación hacia CTLs maduros, que matan selectivamente a las células que expresan el complejo clase I-péptido (21).

La región HLA-D ahora se conoce como región de clase II y abarca aproximadamente 1,000 KB con la subregión DP localizada en el extremo centromérico, la DR en el telomérico y la de DQ en el centro. La subregión DR está formada por 10 loci, El DRA poco polimórfico y 9 loci DRB, del DRB1 al DRB9, de los que sólo los loci DRB1, 3, 4 y 5 se expresan y los demás son pseudogenes. En DQ hay 4 loci, DQA1, DQA2, DQB1 y DQB2, de los cuales sólo se expresan DQA1 y DQB1. En la región DP hay dos genes DPA1 y DPB1 y dos pseudogenes DPA2 y

DPB2. Además, se localizan también los genes DNA, DMA, DMB, LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 y DOB. En la figura 1 se esquematiza el mapa del complejo HLA (22).

Las moléculas clase II son codificadas por dos genes, uno para la cadena α y el otro para la cadena β y el producto de ambos genes forman una glicoproteína heterodimérica que se encuentra unida a la membrana plasmática. La cadena α o pesada, tiene 33-35 KDa y la cadena β , o ligera, es de 27-29 KDa y se encuentran unidas en forma no covalente. La cadena α tiene dos dominios α -1 y α -2, una región TM y una CY. La cadena β está compuesta por los dominios β -1 y β -2, la región TM y la CY. El péptido se une a los dominios α -1 y β -1, que se encuentran en la porción más externa de la molécula clase II, formando el nicho de unión del péptido. La mayor parte del polimorfismo se encuentra en el dominio β -1 de las moléculas clase II, aunque en DQ hay cierta variabilidad en el dominio α -1 y mucho menos en DP α . Los dominios α -2 y β -2 tienen una estructura bastante similar a la de las inmunoglobulinas y pertenecen a esta superfamilia. Existe una cadena invariable (Ii) de 33 KDa, que es el tercer componente de los antígenos clase II y el gen que la codifica está localizado en el cromosoma 5 (23).

Los genes DR y DQ están muy cerca uno del otro, por lo que se encuentran en desequilibrio de enlace; el DP está más alejado de ellos, por lo que el desequilibrio de enlace es débil o no existe. Los genes clase II sólo se expresan en algunas células como las CPAs (M ϕ s, monocitos, células de Langerhans, células dendríticas), en los linfocitos B, Linfocitos T activados, células epiteliales del timo, células endoteliales y en algunas células tumorales (17). La variabilidad de los genes clase II es verdaderamente extraordinaria. Oficialmente, existen descritos 21 antígenos de DR, 9 de DQ y 6 de DP, pero el micropolimorfismo demuestra que hay por lo menos 450 variantes moleculares (24).

Las moléculas clase II, cuya cristalografía se dio a conocer en 1993 (25), unen péptidos generados por la degradación de proteínas por la vía endocítica, internalizando antígenos de la superficie a los endosomas primarios. De allí, pasa a los endosomas secundarios y finalmente a los fagolisosomas. La cathepsina A y B de los lisosomas son las proteasas generadoras de péptidos. El complejo clase II-péptido se forma en el compartimiento prelisosómico, en donde se acumulan las moléculas clase II recién sintetizadas. Las cadenas α y β se ensamblan en el retículo endoplásmico ayudadas por la calnexina y se asocian inmediatamente con la cadena Ii, la que evita que el sitio de unión al péptido se ocupe. Este sitio tiene una considerable variación alélica y acomoda péptidos de 13-25 residuos de aminoácidos (26). Tres heterodímeros clase II forman un complejo noamérico con la cadena Ii trimérica, dirigiéndose así a la vía endocítica. La mayoría de las cadenas Ii son removidas por proteólisis, dependiente de actividades de cathepsina B y D, antes de que las moléculas clase II se acumulen en los compartimientos prelisosómicos ricos en clase II. Las moléculas HLA-DM, que también se acumulan en los compartimientos ricos en clase II, catalizan la remoción dependiente de pH bajo del péptido llamado CLIP (del inglés: **CL**ass II associated **I**nvariant **P**eptide), que cubre el sitio de unión a péptidos de clase II y que se deriva del corte de la cadena Ii. El CLIP mantiene a las moléculas clase II en una conformación relativamente inestable, receptiva para los péptidos antigénicos. El CLIP es eliminado por DM quien aumenta la unión a clase II de otros péptidos generados en la vía endocítica, que pueden inducir el movimiento de las moléculas clase II a una conformación altamente estable. El mecanismo por el cual las moléculas clase II son liberadas del compartimiento pre-lisosómico para la expresión en la superficie no está completamente claro. La microscopía electrónica sugiere que, en algunos casos, el compartimiento que lleva a las moléculas clase II puede fusionarse a la superficie celular, dejando a las moléculas ocupadas por péptidos (21, 27).

La poliposis nasal es aparentemente una enfermedad poligénica, en la que se desconoce cuales podrían ser los genes involucrados que participan en el desarrollo de la enfermedad. Los

estudios de la contribución del HLA en la poliposis nasal muestran segregación familiar en gemelos idénticos, en los que se observa el desarrollo de pólipos a la misma edad aun sin vivir juntos (10) o la aparición de pólipos en uno y de asma en el otro (11). La evidencia de la participación de los genes del HLA clase II proviene también de estudios de individuos no relacionados de Hungría, en los que se ha encontrado una asociación significativa con el haplotipo HLA-DR7-DQA1*0201-DQB1*0202, en pacientes con poliposis nasal, asma e intolerancia al AAS (14). Sin embargo, no se encontró asociación con la poliposis nasal simple o con la poliposis nasal y asma. En sujetos de Austria no relacionados, se ha descrito también asociación de los genes HLA clase I con poliposis nasal, particularmente del HLA-A1-B8 con intolerancia al ASS y HLA-A74 con poliposis nasal simple (16).

Por otro lado, se ha demostrado la expresión de moléculas HLA-DR e ICAM-1 en las células epiteliales de individuos con poliposis nasal, lo que sugiere la participación de las moléculas HLA clase II en la respuesta a probables antígenos que desencadenan una inflamación crónica de la vías respiratorias altas (15), como sería el caso de la poliposis nasal, en la que se propone la intervención de agentes patógenos en la iniciación de la enfermedad. Por otro lado, las poblaciones en las que se ha estudiado la asociación del HLA con poliposis nasal, difieren étnicamente de la población mexicana. Por lo tanto, el análisis de los alelos de los genes HLA-clase II en pacientes mexicanos, contribuiría al conocimiento de la participación de alelos diferentes, o confirmaría la asociación de los ya descritos.

El planteamiento del problema fue ¿La frecuencia de alguno de los alelos de la región de HLA-clase II estará incrementada en los pacientes con poliposis nasal?

JUSTIFICACIÓN.

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

OBJETIVO.

Evaluar la existencia de susceptibilidad genética para desarrollar poliposis nasal asociada al incremento de algún alelo de los genes de HLA-clase II en pacientes con poliposis nasal simple.

HIPÓTESIS.

Si los genes del HLA-clase II están participando en el desarrollo de la poliposis nasal simple, entonces se esperaría que la frecuencia de alguno de los alelos estuviera incrementada en el grupo de pacientes.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

DISEÑO.

Comparativo, abierto, observacional, prospectivo, transversal.

MATERIALES Y MÉTODO.

Universo de estudio.

Se incluyeron 28 pacientes con poliposis nasal simple que acudieron a la consulta externa de otorrinolaringología del Hospital General Manuel GEA González en un periodo comprendido de agosto a diciembre del 2004. De estos pacientes 18 eran del sexo masculino y 10 femenino, con un promedio de edad de 42 años con un rango mínimo de 17 años y máximo 64. Del total de casos, 21 ya habían sido intervenidos quirúrgicamente de cirugía funcional endoscópica de senos paranasales y en 15 de ellos se complementó con un abordaje externo tipo Caldwell Luc. Todos los pacientes postoperados tenían un reporte histopatológico de poliposis inflamatoria nasosinusal. A los pacientes sin antecedente quirúrgico se les realizó una exploración con endoscopio de 0 grados y se les tomó una biopsia insinusal en consultorio para corroborar el diagnóstico.

El tamaño de la muestra, se calculó considerando un caso por control, con alteración de 25% de la frecuencia de por lo menos un alelo en el grupo de pacientes y de 10% en el grupo control, con el 80% de potencia de la prueba y un nivel de confianza de 95%.

En el periodo de agosto a diciembre del 2004 acudieron 28 pacientes con poliposis nasosinusal que cumplían con los criterios de inclusión.

La forma de asignación de los casos a los grupos de estudio fue secuencial.

Criterios de inclusión.

Individuos con poliposis nasal simple, con diagnóstico histopatológico y dispuestos a participar en el estudio.

Criterios de exclusión.

Coexistencia con asma, sensibilidad al ácido acetilsalicílico o ambas (triada de Widal o Samter). Que no accedieran a entrar en el estudio.

Las variables que se analizaron fueron independientes: edad, sexo y alelos HLA clase II, y las dependientes: poliposis nasosinusal.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS.

POBLACIONES

Pacientes con poliposis nasal. Se incluyeron 28 individuos con poliposis nasal simple, diagnosticados en el Servicio de Otorrinolaringología y con confirmación histopatológica.

Testigos. Se incluyeron 230 sujetos no relacionados, que a la exploración otorrinolaringológica no presentan poliposis nasal y no tengan antecedentes de asma o intolerancia al ácido acetilsalicílico.

Extracción de DNA (28). Se tomaron de cada sujeto, 20 ml de sangre periférica, con EDTA como anticoagulante. Se obtuvo el paquete de leucocitos por centrifugación a 1,600 xg a 4°C, durante 15 min. Los eritrocitos se eliminaron con dos o tres lavados de 5 mM de MgCl₂, centrifugando cada vez a 1,600 xg a 4°C durante 15 min, hasta obtener el paquete de

leucocitos libre de eritrocitos. El paquete se trató con: 50 mM NaCl; 10 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.2% SDS; 300 U/ml proteinasa K y se incubó durante 12 h a 53°C.

El DNA se extrajo dos veces con fenol equilibrado (v/v), dos con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (v/v) y dos con cloroformo alcohol isoamílico (24:1) (v/v). En cada extracción se agitó suavemente la mezcla hasta su homogeneización y se centrifugó durante 15 min. a 4°C. El DNA se precipitó con 100 mM final de NaCl y un volumen de isopropanol. Una vez precipitado, se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0).

TIPIFICACIÓN DE LOS ALELOS CLASE II DQA1, DQB1 (29, 30)

Cuantificación del DNA (28). El DNA extraído de cada sujeto se diluyó 1:100 y se leyó a 240 nm, 260 nm y 280 nm. La concentración del DNA se calculó tomando la lectura a 260 nm X la dilución X 50 (coeficiente de extinción molar del DNA). La pureza se verificó haciendo las relaciones de las lecturas a 260/240 y 260/280, que debieron estar entre 1.7 y 2.0.

Amplificación del DNA (29, 30). Para cada individuo se amplificó el segundo exón de los loci DQA1 y DQB1.

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

Verificación de la amplificación. Se tomaron 10 µl del producto de cada amplificación y se les añadió 5 µl de colorante para corrimiento (50% glicerol; 0.01% rojo de cresol). Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% con TAE y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, durante 40 min a 90 voltios. El gel se observó con luz UV (312 nm) y se fotodocumentó para su registro.

TIPIFICACIÓN CON OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS POR EL MÉTODO DE SONDAS ESPECÍFICAS DE SECUENCIA (SSOPs) (29, 30)

Sembrado de las muestras. Dependiendo de la intensidad de la banda de amplificación, se tomaron de 40 µl a 80 µl para sembrar 8 membranas en un formato de dot-blot. Se llevó a un volumen final de 400 µl con TE, utilizando cajas de polipropileno con formato de 96 pozos. Se cortaron membranas de nylon positivamente cargadas de 12 cm X 8 cm. Para sembrar las muestras se utilizó un aparato de dot-blot (Bio-Rad). El DNA de las membranas se desnaturizó con 0.4 M NaOH durante 10 min y se neutralizó con 10X SSPE durante 10 min. El DNA se fijó a la membrana durante 30 seg con luz UV (312 nm).

Marcaje de los SSOs (30). Se colocaron 100 pmoles de cada SSOP en tubos de 1.5 ml, se añadió 1 nmol de ddUTP-digoxigenina, 5 mM cloruro de cobalto, amortiguador para desoxittransferasa terminal (TdT), 37 U de TdT (Boehringer) y agua destilada para un volumen final de 40 µl. La reacción se incubó a 37°C durante 45 min. El SSOP marcado se llevó a un volumen de 100 µl de TE (1pmol/ml). En el cuadro 3 se muestran las sondas que se emplearon para la tipificación.

Prehibridación e hibridación de las membranas. Cada membrana se colocó en un tubo de polipropileno de 15 ml, se añadieron 10 ml de la mezcla de prehibridación y se incubaron durante 12 h a 42°C. Se eliminaron 5 ml de la solución y se añadieron 20 picomoles del SSOP marcado con ddUTP-digoxigenina. Las membranas se incubaron durante 12 h a 42°C.

CUADRO 1. INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS LOCI HLA-CLASE II

NOMBRE	CODONES EXÓN 2	SECUENCIA	TAMAÑO DE LA BANDA
DQA1			
2DQAAMP-A	11-18	AT GGT GTA AAC TTG TAC CAG T	229 bp
2DQAAMP-B	80-87	TT GGT AGC AGC GGT AGA GTT G	
DQB1			
2DQBAMP-A	13-20	C ATG TGC TAC TTC ACC AAC GG	214 bp
2DQBAMP-B	78-84	CTG GTA GTT GTG TCT GCA CAC	

CUADRO 2. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES HLA

Gen	Desnaturalización	Alineación	Extensión	MgCl ₂ Final
DQA1	94°C/ 1 min	55°C/ 1 min	72°C/ 1 min	1.5 mM
DQB1	94°C/ 1 min	55°C/ 1 min	72°C/ 1 min	1.5 mM

Tomado del XII Taller Internacional de Histocompatibilidad (30).

CUADRO 3. SONDAS RECOMENDADAS POR EL XII TALLER INTERNACIONAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD PARA LA TIPIFICACION DE LOS GENES CLASE II (25).

SONDAS EMPLEADAS EN LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DQA1

No. De sonda	Tm°C	Alelo(s)
2501	56	*0101,0102,0104,0401,05011,05012,05013,0502
2502	56	*0102,0103,0601
2503	56	*03011,03012,0302
3401	56	*0101,0104
3402	56	*102,0103,05011,05012,05013,0502,
3403	58	*0401,0601
4101W	56	*0101,0102,0104,0201,03011,03012,0602
4102	56	*0103
4103W	58	*0401,05011,05012,05013,0502,0601
5501W	50	*0101,0102,0103,0104
5502	50	*0201
5503	50	*03011,03012,0302
5504	46	*0401,0601,05011,05012,05013,0502
5902W	52	*0502
6901	54	*0101,0102,0103,0104
6902	50	*0201,03011,03012
6903	50	*03012,05011,05012,05013,0502
6904	52	*0401,0601
7502	48	*0201,0401,0601
7504	48	*05011,05012,05013,0502

SONDAS UTILIZADAS PARA LA TIPIFICACIÓN DEL GEN DQB1

No. De Sonda	Tm ^o C	Alelo (s)
2301	64	*0401
2302	66	*0402,03031,0305
2601	60	*0501,0502,05031,05032
2602	52	*0301,0304,06011,06012
2603	54	*0302,03031,03032,0602
2604	54	*0603,0604,0607,0608
2605W	58	*0201,0202
2606	52	*06051,06052,0606,0609
3702	60	*06011,06012
3703W	52	*0504
3705	60	*0301,0302,03031,03032,0304
4501	62	*0301,0304
4901	62	*0501
5701	60	*0501,0604,06051,0606,0608,0609
5702	62	*0502,0504
5703	62	*05031,06011,06012
5704	60	*05032,0602,0603,0607
5705	64	*0201,0202
5708	64	*0401,0402
7001W	66	*0501,0502,05031,05032
7002	60	*06011,06012
7003	66	*0602,0605,0608

Quimioluminiscencia. Las membranas se lavaron dos veces con 2X SSPE, 1% SDS a temperatura ambiente durante 10 min, dos veces a la Tm de cada SSOP (Tm= 2 (A+T)+4 (G+C)) con 6X SSPE, 1% SDS durante 15 min. Posteriormente se lavaron con AMORTIGUADOR 1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.3% Tween 20) dos veces durante 5 min a temperatura ambiente. Se incubaron con reactivo bloqueador (Roche) (AMORTIGUADOR 2) durante 30 min a temperatura ambiente. Después se incubaron con Fab anti-digoxigenina (Roche) 1:10,000 en AMORTIGUADOR 2 durante 60 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con amortiguador 1, se incubaron 5 min a temperatura ambiente con AMORTIGUADOR 3 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂). Finalmente se incubaron 5 min a temperatura ambiente con CSPD (Roche) diluido 1:500 en amortiguador 3. Se eliminó el exceso de CSPD de las membranas y se colocaron en bolsas de plástico transparente, se sellaron con calor, se incubaron a 37°C durante 15 min y se expusieron a placas de rayos X durante 15 min. Se llevaron a cabo varias exposiciones para el análisis correcto de los resultados (5 min, 10 min, 15 min, 20 min).

VALIDACIÓN DE DATOS.

Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias alélicas (FA) por conteo directo. Se compararon las FA entre los pacientes y los testigos. Para probar asociaciones significativas entre los alelos y la enfermedad se utilizó la prueba de χ^2 con la corrección de Yates, o la prueba exacta de Fisher, considerando $p < 0.05$ como el mínimo nivel de significancia, además de la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples cuando el valor de p fue significativo, multiplicando la p por el número de alelos detectados en cada locus y por el número de comparaciones (p_c). El resultado se consideró significativo con $p_c < 0.05$ (34). Se calculó la razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95% mediante la aproximación de Cornfield. En el caso de asociación de alelos particulares se calculó la fracción etiológica (FE) o la fracción preventiva (FP).

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

De los 28 pacientes con poliposis nasosinusal simple (no asociada a otras entidades como asma o intolerancia al AAS), 18 eran del sexo masculino, 10 femenino, con un promedio de edad de 42 años.

En el cuadro 1 se muestran las frecuencias alélicas de los genes DQA1 y DQB1 obtenidas en los 28 pacientes con poliposis nasal y en los 230 testigos. Se puede observar en el cuadro que los alelos DQA1*0401 (OR = 2.96 {1.62-5.40}; $p = 0.0005$, $p_c = 0.003$) y DQB1*0402 (OR = 2.91 {1.59-5.31}; $p = 0.0007$, $p_c = 0.007$) están asociados con la poliposis nasal, con una FE de 23.7% y 23.5%, respectivamente. En el cuadro 2 se presentan las frecuencias haplotípicas, sobresale el haplotipo DQA1*0401-DQB1*0402 que fue el más frecuente en los pacientes con poliposis y presentó una asociación altamente significativa con la enfermedad (OR = 2.96 {1.62-5.40}; $p = 0.0005$). En el cuadro 3 se observan las frecuencias alélicas y genotípicas de la posición -308 del promotor de TNF α en 28 pacientes y en 103 testigos. Como se podrá ver no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos.

DISCUSIÓN.

En este estudio se encontraron dos alelos involucrados en la susceptibilidad a desarrollar poliposis nasal sin asma y sin intolerancia al AAS, DQA1*0401 y DQB1*0402, que contribuyen con el 23.7% y 23.5% respectivamente. Estos dos alelos podrían estar participando en forma independiente y aditiva en la enfermedad, alternatively podría explicarse por efecto del desequilibrio de ligamiento, ya que este haplotipo se encuentra frecuentemente ligado en los mestizos mexicanos (35). No obstante, al realizar el análisis de los haplotipos se encontró que el haplotipo DQA1*0401-DQB1*0402 estaba fuertemente asociado con la enfermedad ($p = 0.0005$, FE = 31%), lo que sugiere que la molécula DQ a la que dan lugar estos genes, acomoda péptidos que inducen el desarrollo o el mantenimiento de la enfermedad, esto significa que se presenta una respuesta poco eficiente, en el caso de pensar en una etiología infecciosa; o podría propiciar una reacción exacerbada, en el caso de suponer una etiología alérgica. Sin embargo, esto tendrá que ser confirmado en estudios posteriores. Por otro lado, el haplotipo descrito probablemente se encuentre en desequilibrio de ligamiento con un DRB1*08, lo cual constituye el haplotipo clase II completo que podría presentar una asociación más significativa con la enfermedad, indicando que los individuos que lo presenten tendrán un mayor riesgo de adquirir la poliposis nasal. Esta asociación no puede confirmarse en este momento, sino hasta que se determinen los alelos de la región DRB1. Lo que se puede concluir actualmente, es que los sujetos que presentan el haplotipo DQA1*0401-DQB1*0402 tienen 2.9 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad que los que no lo presentan.

Los hallazgos encontrados difieren de los descritos previamente para la poliposis nasal (12, 29), que muestran una asociación significativa con el haplotipo HLA-DR7-DQA1*0201-DQB1*0202 con poliposis nasal asociada a asma y a intolerancia al AAS, así como del haplotipo HLA-A1-B8 con intolerancia al AAS y del antígeno HLA-A74 con poliposis nasal simple. Esta última asociación se estableció con un número muy reducido de pacientes (N=3) y con métodos serológicos de tipificación, por lo que tales conclusiones deben ser verificadas.

El análisis de la posición -308 del promotor de TNF α no mostró ninguna diferencia significativa entre el grupo de pacientes y el grupo de testigos, por lo que se sugiere que esta citocina podría no estar participando en la enfermedad. Sin embargo, aún es necesario analizar los otros polimorfismos descritos para este gen, los cuales podrían estar participando en la regulación de la producción de esta citocina y, de alguna manera, contribuir en el proceso de la enfermedad. Considerando que la evolución de la poliposis se debe a la generación de una respuesta inflamatoria, sería importante analizar los polimorfismos descritos para varias citocinas de la respuesta inmunológica, ya que podrían estar participando directa o indirectamente en el desencadenamiento de la enfermedad, debido a que juegan un papel fundamental en la regulación de la misma. Los polimorfismos en varios genes de citocinas, principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), o microsatélites localizados dentro

de la región promotora o de otras regiones reguladoras, afectan la transcripción de los genes y causan variaciones interindividuales en la producción de citocinas, confiriendo flexibilidad a la respuesta inmunológica. Se ha descrito que la presencia de ciertos alelos de la interleucina-1 (IL-1) y de la IL-10 pueden influenciar el resultado de infecciones bacterianas (36, 37), así como contribuir a la susceptibilidad y resistencia en enfermedades autoinmunes (38), como la IL-12 en diabetes tipo I (39); además se han asociado con la sobrevida en cáncer de vejiga y de páncreas, en la que los polimorfismos de interferón gamma juegan un papel importante (40, 41). Por lo tanto el estudio de los polimorfismos de las citocinas sería el siguiente paso obligado en la exploración de los mecanismos inmunológicos que desencadenan la poliposis nasal.

CONCLUSIONES.

En este estudio se encontraron dos alelos involucrados en la susceptibilidad a desarrollar poliposis nasosinusal, DQA1*0401 y DQB1*0402, que contribuyen con el 23.7% y 23.5% respectivamente.

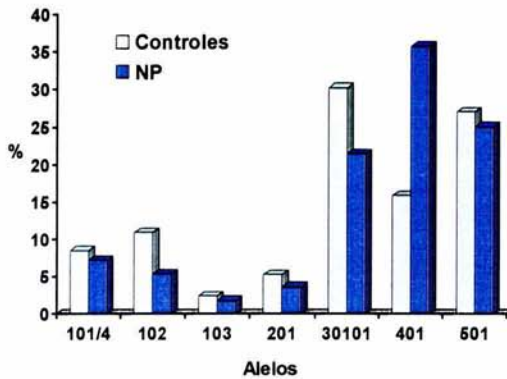
Lo que se puede concluir actualmente, es que los sujetos que presentan el haplotipo DQA1*0401-DQB1*0402 tienen 2.9 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad que los que no lo presentan.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

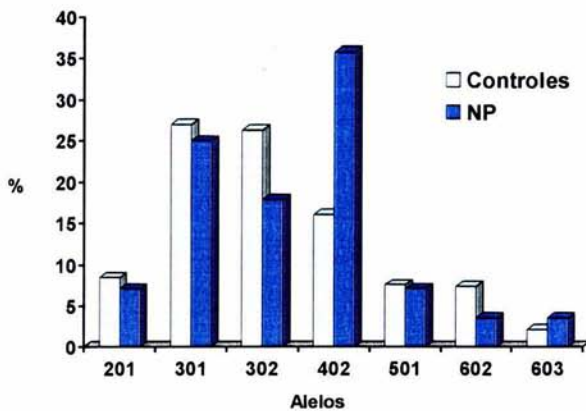
Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección II, investigación con riesgo mínimo, se anexa hoja de consentimiento informado.

FRECUENCIA DE LOS ALELOS DQA1



FRECUENCIA DE LOS ALELOS DQB1



RESULTADOS. Tablas de frecuencia de los alelos DQA1 gráfica 1, DQB1 gráfica 2.

NP=Poliposis nasal.

CUADRO 1. Distribución de los alelos de DQA1 y DQB1 en pacientes con poliposis nasal y en testigos.

Locus	Pacientes FA (%)	Testigos FA (%)	χ^2 Y	<i>p</i>	<i>p_c</i>	OR (95% CI)	FE (%)
DQA1							
*0101/4	7.14	8.48					
*0102	5.36	10.87					
*0103	1.79	2.39					
*0201	3.57	5.22					
*030101	21.43	30.22					
*0401	35.71	15.87	11.99	0.0005	0.003	2.96 (1.62-5.40)	23.7
*0501	25.00	26.96					
DQB1							
*0201	7.14	8.48					
*0301	25.00	26.96					
*0302	17.86	26.30					
*0402	35.71	16.09	11.62	0.0007	0.007	2.91 (1.59-5.31)	23.5
*0501	7.14	7.61					
*0602	3.57	7.39					
*0603	3.57	2.17					

FA=Frecuencia Alélica OR = Razón de Momios, CI = Intervalo de Confianza, FE = Fracción Etiológica.

CUADRO 2. Distribución de haplotipos

Haplotipo	Pacientes	Testigos	X²Y	P	OR (95% CI)	EF
DQA1-DQB1	FH (%)	FH%				(%)
*0101/4-*0501	7.14	6.74				
*0102-*0602	3.57	6.96				
*0102-*0603	1.79	0.65				
*0103-*0603	1.79	1.30				
*0201-*0201	3.57	4.35				
*030101-*0301	3.57	2.83				
*030101-*0302	17.86	26.74				
*0401-*0402	35.71	15.87	11.99	0.0005	2.96 (1.62-5.40)	31
*0501-*0201	3.57	3.48				
*0501-*0301	21.43	23.48				

FH = Frecuencia Haplotípica, OR = Razón de Momios, CI = Intervalo de Confianza, FE = Fracción Etiológica.

CUADRO 3. Frecuencias alélicas y porcentaje de los genotipos de la posición -308 del promotor de TNF α

Frecuencia alélica	Pacientes (%)	Testigos (%)
TNF1 (G)	92.9	94.7
TNF2 (A)	7.1	5.3
Genotipo		
GG	85.7	89.3
GA	14.3	10.7
AA	0.0	0.0

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Settupane GA, Lund VJ, Bernstein JM, Tos M. Nasal polyps: epidemiology, Pathogenesis and Treatment. 1997. OceanSide Publications, Inc. Providence, Rhode Island.
2. Larsen, Per L. MD; Tos, Mirko MD. Origin of Nasal Polyps: An Endoscopic Autopsy Study. *Laryngoscope*.114(4):710-719, April 2004.
3. Settupane GA, Chafee FH. 1977. Nasal polyps in asthma and rhinitis: a review of 6,037 patients. *J Allergy Clin Immunol* 59: 17-21.
4. Widal MF, Abrami P, Lermoyez J. 1922. Anaphyaxie et idiosyncrasie. *Presse Med* 30: 189.
5. Samter M, Beers RF. 1967. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy* 40: 281-293.
6. Naclerio R, Durham S, Mygind N. 1999. Rhinitis. Mechanisms and management. Marcel Dekker, Inc. New York.
7. Bent JP, Kuhn FA. 1994. The diagnosis of allergic fungal sinusitis. *Otolaryngol Head Neck* 111: 580-588.
8. Bent JP, Kuhn FA. 1996. Allergic fungal sinusitis/polypoidosis. *Allergy Asthma Proc* 17: 259-68.
9. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, Roberts GD. 1999. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc* 74: 877-884.
10. Drake-Lee A. 1992. Nasal polyps in identical twins. *J Laryngol Otol* 106: 1084-1085.
11. Lockey RF, Rucknagel DL, Vanselow NA. 1973. Familial occurrence of asthma, nasal polyps, and aspirin intolerance. *Ann Inter Med* 78: 17-24.
12. Mullet J, Xaubet A, Gaya A, Roca-Ferrer J, López E, Fernández JC, Fernández MD, Picado C. 1995. Cytokine gene expression and release from epithelial cells. A comparison study between healthy nasal mucosa and nasal polyps. *Clin Exp Allergy* 25: 607-615.
13. Parnes, Steven M. MD. The role of leukotriene inhibitors in patients with paranasal sinus disease. *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery*. 11(3):184-191, June 2003.
14. Molnar-Gabor E, Endreffy E, Rozsasi A. 2000. HLA-DRB1, -DQA1 and DQB1 genotypes in patient with nasal polyposis. *Laryngoscope* 110: 422- 425.
15. Papón JF, Coste A, Gendron MC, Cordonnier C, Wingerstmann L, Peynegre R, Escudier E. 2002. HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *Laryngoscope* 112: 2067-2075
16. Luxenberger W, Posch U, Berghold A, Hofmann T, Lang-Loidolt D. 2000. HLA patterns in patients with nasal polyposis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257:137-139.
17. Mizuky N, Inoko H, Ohno S. 1994. Role of HLA and T lymphocytes in the immune response. *Ocular Immunol Inflammat* 2:57-91.
18. So A. 1994. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. Lechler, R. HLA and Disease. Academic Press. Great Britain, pp1-34.
19. Bjorkman JH, Saper MA, Samaroui B, Nennet WS, Strominger JL, Wiley DC. 1987. Structure of the human histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-518.
20. Ortmann B, Andrelewicz MJ, Cresswell P. 1994. MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368:864-867.
21. Brodsky F, Lem L, Bresnahan P. 1996. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 47:464-471.
22. Campbell RD, Trowsdale J. 1993. Map of the human MHC. *Immunol Today* 14:349-352.
23. Cresswell P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12:259-294.
24. Bodmer JH, Marsh SGE, Albert DE, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasasuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki P. 1995. Nomenclature for factors of the HLA system. 1995. *Human Immunol* 43:149-164.
25. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.

26. Madden DR. 1995. The three dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 12:181-208.
27. Raposo G, Nijman H, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding C, Melief C, Geuze H. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161-1172.
28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
29. Tsuji K, Aisawa M, Sasasuki T. 1992. *HLA 1991*. Oxford University Press, Oxford.
30. Bignon JD, Fernández-Viña M. 1995. *Technical Handbook*, Twelfth International Histocompatibility Workshop. Publisher: HLA et médecine. Paris, France.