



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“LOS ALELOS DE LOS RECEPTORES KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*)
EN LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HOSPEDERO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

EYERAHI BRAVO FLORES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“LOS ALELOS DE LOS RECEPTORES KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*)
EN LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HOSPEDERO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

EYERAHÍ BRAVO FLORES

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013.



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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de (Biología Experimental y Biomedicina), en su sesión ordinaria del día 11 de febrero de 2013, aprobó el jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **BRAVO FLORES EYERAHI** con número de cuenta **403011623**, con la tesis titulada **“LOS ALELOS DE LOS RECEPTORES KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptor*) EN LA ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HOSPEDERO”**, bajo la dirección de la **DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
Vocal: DRA. INGEBOURG DOROTHEA BECKER FAUSER
Secretario: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Suplente: DRA. MARTHA ROBLES FLORES
Suplente: DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de abril de 2013

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

Agradezco:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por darme el gran privilegio de formar parte de su alumnado y permitirme cumplir un logro más en mi carrera profesional.

Los apoyos económicos con los que se contaron para la realización de este proyecto:

Beca de Maestría CONACYT (No. de Becario: 289934)

Beca de la Coordinación de Investigación en salud del IMSS (No. de Matrícula: 99095944)

Apoyo al Proyecto de Investigación por la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS
(No. de Proyecto: FIS/IMSS/PROT/G11/953)

A los miembros del Comité Tutor por todas sus aportaciones:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

Dra. Silvia Patricia Pérez Vera.

El presente trabajo fue realizado
en el Laboratorio de Histocompatibilidad
de la Unidad Médica en Inmunología
del Hospital de Pediatría en CMN-SXXI del IMSS,
bajo la dirección de la Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez.

DEDICATORIAS

Para todos ustedes quienes son la razón de que yo haga lo que hago.

A mi pequeña *Valentina*, porque al ser el pilar de mi vida me das la fuerza para continuar con mi camino y así poder empezar a construir tu destino, hasta el día en el que pueda verte convertida en un gran ser humano.

A mi esposo *Javier*, quien llena todas mis expectativas, por ser la persona que me apoya para librar todos los obstáculos de mi vida y alienta para seguir creciendo día con día, pero especialmente por amarme tanto sin importar todos mis defectos.

A mi Padre *Valentín*, por sus enseñanzas y los recuerdos de cuando niña que me hacían verlo gigante!! y hoy que soy adulta me hacen verlo aún más grande, pero simplemente por amarlo tanto. Gracias por ser mi padre...

A mi Madre *Macrina*, por darme unas alas y el coraje para volar, porque puedo contar con ella en los momentos difíciles y compartir mis alegrías, simplemente por ser un tesoro preciado e invaluable que agradeceré a DIOS eternamente.

A mis Hermanas *Saayra Jhanín* y *Cynthia Montserrat*, porque vimos pasar días inmensos juntas en los que teníamos siempre algo nuevo que enseñarnos y descubrir que la vida nos tenía sorpresas preparadas para el futuro.

A mis suegros *Clemente y Guillermina*, por las lecciones de vida que me enseñaron y la confianza que pusieron en mí.

A mis cuñados *Esther, Claudia, Rosario y Clemente*, por darme la oportunidad de integrarme a su familia y su apoyo incondicional cuando más lo necesitamos.

Valentina siempre recuerda esto y nunca lo olvides:

“Llegarás tan lejos como tú te lo propongas,
recuerda no separarte del camino.
Lucha contra todo y alcanza tus metas,
no te desesperes si tarda en llegar;
pues todo llega si luchas por ello,
solo haz lo correcto y se te cumplirá.”

La vida, no es una vela que se apaga;
es más bien, una espléndida antorcha
que sostienes en tus manos durante un momento,
y debes hacer que arda con la máxima claridad posible
antes de entregarla a las futuras generaciones.

GEORGE BERNARD SHAW.

AMIGA (Wendy Guadalupe Vázquez González)

Gracias por todos los momentos que hemos compartido
momentos llenos de sentimientos y pensamientos compartidos,
sueños y anhelos, secretos, risas y lágrimas.

Gracias por dedicarme tiempo;
tiempo para demostrar tu preocupación por mí,
tiempo para escuchar mis problemas y ayudarme a buscarles solución,
pero sobre todo, tiempo para sonreír y mostrarme tu afecto.

Gracias por ser lo que eres;
una persona maravillosa con quien puedo contar.

Y ten por seguro que cada preciado segundo
quedará atesorado eternamente en mi corazón.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
I. INTRODUCCIÓN	
1. LEUCEMIA	
1.1. Definición	17
1.2. Etiología	17
1.3. Clasificación	17
1.4. Epidemiología	19
1.5. Tratamiento	20
2. TRASPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS	
2.1. Antecedentes	22
2.2. Generalidades del TCPH	26
2.3. Tipos de TCPH	28
2.4. Fuentes de obtención de las CPH	29
2.5. Criterio genético para un TCPH	33
3. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HOSPEDERO	
3.1. Generalidades de la EICH	33
3.2. Factores de riesgo para el desarrollo de la EICH	34
3.3. Tipos de EICH y manifestaciones clínicas	35
3.3.1. EICH aguda	36
3.3.2. EICH crónica	37
4. CÉLULAS NK	
4.1. Generalidades de las células NK	38
4.2. Función de las células NK	39
4.3. Receptores de las células NK	40
5. RECEPTORES KIR	
5.1. Organización genómica y génica de KIR	43
5.2. Estructura molecular de las proteínas KIR	46
5.3. Función y especificidad de los receptores KIR	49
5.4. Diversidad de los receptores KIR	52
5.4.1. Contenido de genes <i>KIR</i>	53
5.4.2. Polimorfismo en la secuencia de nucleótidos de genes <i>KIR</i>	56
5.4.3. Diversidad en el repertorio de receptores KIR sobre clonas de células NK	56

5.5.	Función de KIR en el TCPH	58
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	59
III.	JUSTIFICACIÓN	60
IV.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	61
V.	HIPÓTESIS	62
VI.	OBJETIVO GENERAL	63
VII.	OBJETIVOS PARTICULARES	64
VIII.	METODOLOGÍA	
8.1.	Tamaño de la muestra	65
8.2.	Características de los binomios donador-receptor para el estudio	65
8.2.1.	Criterios de inclusión	65
8.2.2.	Criterios de exclusión	65
8.2.3.	Criterio de eliminación	66
8.3.	Obtención de las muestras de ADN	66
8.4.	Determinación de genes y alelos <i>KIR</i> por PCR-SSP	67
8.5.	Análisis estadístico	67
IX.	RESULTADOS	
9.1.	Características de la población de estudio	68
9.2.	Tipificación de genes <i>KIR</i>	69
9.3.	Frecuencias génicas de KIR	70
9.3.1.	Pacientes con leucemia y donadores	70
9.3.2.	Pacientes con TCPH	70
9.3.3.	Pacientes sin EICH	72
9.3.4.	Pacientes con EICH	72
9.3.5.	Pacientes con EICH aguda y crónica	74
9.4.	Frecuencias genotípicas de KIR	76
9.4.1.	Pacientes con leucemia y donadores	76
9.4.2.	Pacientes con TCPH	78
9.4.3.	Pacientes sin EICH	79
9.4.4.	Pacientes con EICH	80
9.4.5.	Pacientes con EICH aguda y crónica	81
9.5.	Frecuencias haplotípicas de la porción centromérica y telomérica de KIR	83
9.5.1.	Pacientes con TCPH	83
9.5.2.	Pacientes sin EICH	85
9.5.3.	Pacientes con EICH	86

9.5.4. Pacientes con EICH aguda y crónica	87
9.6. Frecuencias alélicas de KIR	89
9.6.1. Frecuencias alélicas y genotípicas del gen <i>KIR2DS4</i>	89
9.6.1.1. Pacientes con TCPH	89
9.6.1.2. Pacientes sin EICH	91
9.6.1.3. Pacientes con EICH	92
9.6.1.4. Pacientes con EICH aguda y crónica	93
9.6.2. Frecuencias alélicas y genotípicas del pseudogen <i>KIR3DP1</i>	96
9.6.2.1. Pacientes con TCPH	96
9.6.2.2. Pacientes sin EICH	97
9.6.2.3. Pacientes con EICH	98
9.6.2.4. Pacientes con EICH aguda y crónica	99
9.7. Evaluación del quimerismo mediante genes y alelos <i>KIR</i>	101
X. DISCUSIÓN	108
XI. CONCLUSIONES	118
XII. LIMITACIONES	120
XIII. PERSPECTIVAS	121
XIV. RESUMEN DE RESULTADOS	122
XV. BIBLIOGRAFÍA	123

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ARN	Ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés: <i>Ribonucleic Acid</i>)
BCR	Receptor de la célula B (por sus siglas en inglés: <i>B Cell Receptor</i>)
CD	Antígenos de diferenciación leucocitaria (por sus siglas en inglés: <i>Cluster of Differentiation</i>)
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
CTL	Linfocito T citolítico
DAP	Proteína adaptadora a dominios (por sus siglas en inglés: <i>Domain Adapter Protein</i>)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EBV	Virus de Epstein-Bar (por sus siglas en inglés: <i>Epstein-Barr virus</i>)
EICH	Enfermedad de injerto contra hospedero
EICHa	Enfermedad de injerto contra hospedero aguda
EICHc	Enfermedad de injerto contra hospedero crónica
G-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas (por sus siglas en inglés: <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas y macrófagos (por sus siglas en inglés: <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GvHD	Enfermedad de injerto contra hospedero (por sus siglas en inglés: <i>Graft versus-Host Disease</i>)
GvL	Injerto contra leucemia (por sus siglas en inglés: <i>Graft-versus-Leukemia</i>)
HLA	Antígeno leucocitario humano (por sus siglas en inglés: <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IFN	Interferón
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ITAM	Motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina (por sus siglas en inglés: <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>)
ITIM	Motivos de inhibición del inmunoreceptor basados en tirosina (por sus siglas en inglés: <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i>)
KIR	Receptor tipo inmunoglobulina de la célula asesina (por sus siglas en inglés: <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor</i>)
LL	Leucemia linfoide
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLC	Leucemia linfoide crónica
LM	Leucemia mieloide
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LRC	Complejo de receptores para leucocitos (por sus siglas en inglés: <i>Leukocyte Receptor Complex</i>)
mHags	Antígenos menores de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés: <i>Human minor histocompatibility antigens</i>)

MIC	Gene relacionado con la cadena MHC de clase I (por sus siglas en inglés: <i>MHC class I chain-related gene</i>)
MO	Médula ósea
NK	Célula asesina natural (por sus siglas en inglés: <i>Natural Killer cell</i>)
PCR-SSP	Reacción en cadena de la polimerasa con primers de secuencia específica (por sus siglas en inglés: <i>Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SCU	Sangre de cordón umbilical
SP	Sangre periférica
SPM	Sangre periférica movilizada
TCPH	Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas
TCR	Receptor de la célula T (por sus siglas en inglés: <i>T Cell Receptor</i>)
TCU	Trasplante de cordón umbilical
TGO	Transaminasa glutámico oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica
TMO	Trasplante de médula ósea
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSPM	Trasplante de sangre periférica
ULBP	Proteína de unión larga única (por sus siglas en inglés: <i>Unique long-binding protein</i>)
OR	Razón de momios (por sus siglas en inglés: <i>Odds Ratio</i>)
IC	Intervalo de Confianza

RESUMEN

La EICH ocurre frecuentemente en los pacientes sometidos a un TCPH, aun cuando el donador y receptor son HLA idénticos debido a la participación de otros genes involucrados en la respuesta inmune. En este contexto, asociado a un TCPH HLA idéntico, diferencias en los genes KIR entre el binomio donador-receptor pueden modular el desarrollo y la severidad de la EICH. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar el papel del polimorfismo de los genes KIR en pacientes con TCPH que desarrollaron EICH. Los genes KIR así como las variantes alélicas de KIR2DS4 y KIR3DP1, fueron tipificados en 37 binomios donador-receptor relacionados HLA idénticos sometidos a un TCPH; mediante la técnica de PCR-SSP. La participación del polimorfismo de los genes *KIR* fue analizada en pacientes con leucemia o alguna enfermedad hemato-oncológica que desarrollaron EICH aguda y crónica. La distribución de las frecuencias génicas, genotípicas, haplotípicas y alélicas de KIR se compararon estadísticamente mediante la prueba de χ^2 siendo significativos los que presentan valores $p < 0.05$.

Los genes *KIR2DL5A*, *2DS1*, *2DS5* y *3DS1* se asociaron con el riesgo a padecer leucemia; mientras *KIR2DL5B* y *2DS3* podrían proteger a los donadores de dicho padecimiento, aun con la predisposición genética que tienen al estar directamente relacionados con los pacientes leucémicos. Finalmente, el gen *KIR2DS3* presentó asociación con el riesgo a padecer EICH crónico después de un TCPH alogénico HLA idéntico.

En cuanto a los haplotipos KIR, después de haber analizado la región centromérica y telomérica, se identificó un nuevo haplotipo presentando la inserción del gen *KIR2DS3* o *KIR2DS5* en la región telomérica.

Con respecto a las variantes alélicas de KIR2DS4 y KIR3DP1, se observó la asociación de los genotipos de KIR2DS4 y KIR3DP1 con factor de riesgo al desarrollo de EICH crónico. Los pacientes con un genotipo x/D, hemicigoto para el gen *KIR2DS4* portador de los alelos *KIR2DS4*003-004/006-010/012-013* con la delección, presentaron una OR=3.9, IC95%:1.8-8.4, $p=0.0004$; mientras que los pacientes con genotipo F/D heterocigoto para los alelos de KIR3DP1 (*KIR3DP1*001-002/004/007/009* – *KIR*003/005-006/008010*) mostraron una OR=2.0, IC95%:1.1-3.7, $p=0.02$ respectivamente.

El análisis molecular de genes y variantes alélicas de KIR, permitió establecer patrones genéticos que determinan el quimerismo en los pacientes sometidos a un TCPH.

Estos resultados sugieren que el polimorfismo de los genes KIR constituye otro parámetro importante que debe ser tomado en cuenta para la selección adecuada de los donadores de CPH y podrían ser marcadores útiles para predecir el curso del trasplante (comportamiento del injerto, rechazo o recaída) y administración de inmunoterapia adicional de forma oportuna.

ABSTRACT

The development of GvHD after related allogeneic HSCT occurs even when donor-recipient pairs are HLA-identical due to the involvement of other genes in these immune response. In this context, KIR genes differences between donor and receptor HLA matched can modulate the development and severity of GvHD. Therefore, the aim of this study was evaluate the role of KIR genes polymorphism in HSCT patients who developed GvHD. KIR genes and allelic variants of KIR2DS4 and KIR3DP1 were identified in 37 donor-recipient pairs HLA-identical related allogeneic HSCT, by PCR-SSP. The involvement of KIR gene polymorphism was analyzed in leukemic patients or with hemato-oncological disease who develop acute and chronic state GvHD. The genes, genotypes, haplotypes and alleles KIR frequencies distribution were compared using the χ^2 test with a value of $p < 0.05$.

Genes *KIR2DL5A*, *2DS1*, *2DS5* and *3DS1* were associated with leukemia risk, while *KIR 2DL5B* and *2DS3* could protect donors against that condition, although their genetic predisposition for being directly related to leukemic patients. Finally *KIR2DS3* gene was associated with risk to developing chronic state GvHD after HLA-identical related allogeneic HSCT.

As KIR haplotypes, after having analyzed the centromeric and telomeric region, we identified a new haplotype, which have an insertion of *KIR2DS3* or *KIR2DS5* gene in the telomeric region.

Regarding to alleles of KIR2DS4 and KIR3DP1 we were observed association of genotypes KIR2DS4 and KIR3DP1 with risk to developing chronic state GvHD. Our results showed that patients with hemizygous genotype x/D for KIR2DS4 gene carrying KIR2DS4*003-004/006-010/012-013 deletion alleles, showing an OR=3.9, 95% IC:1.8-8.4, $p=0.0004$ and patients with heterozygous genotype F/D for KIR3DP1 alleles (KIR3DP1*001-002/004/007/009 - KIR*003/005-006/008010) showing an OR=2.0, 95% CI: 1.1-3.7, $p=0.02$ respectively, were associated with risk to developing chronic state GvHD in HSCT recipients.

Molecular analysis of genes and allelic variants KIR, allowed to establish genetic patterns that determine the chimerism in patients undergoing HSCT.

These results suggest that KIR genes polymorphism is another important parameter for selection of HSCT donors and these could be useful markers for determining the course of transplantation (behavior graft rejection or relapse) and administration of immunotherapy timely.

I. INTODUCCIÓN

1. LEUCEMIA

1.1. Definición

Las leucemias, son neoplasias malignas hematológicas, que se caracterizan por la proliferación y crecimiento descontrolado de células inmaduras, ya sean linfoides para leucemia linfóide (LL) o mieloides para leucemia mieloide (LM). Un solo progenitor leucémico autorrenovable con transformación maligna por mutación somática espontánea o por agentes externos (radioactivos, químicos o virales), da origen a blastos incapaces de diferenciarse con estímulos fisiológicos normales, convirtiéndose en las células predominantes en la médula ósea (MO) con su posterior infiltración a sangre causando una función anormal (Laskaris, 2006; Cannobio, 2006).

1.2. Etiología

Existen diversos factores que predisponen el desarrollo de leucemia en algunos individuos como son: factores genéticos, ocupacionales, exposición previa a quimioterapia, radiación, antecedentes de desórdenes hematológicos y el fumar es considerado un hábito que aumenta el riesgo, debido a los metabolitos inhalados del humo del tabaco (Cannobio, 2006).

1.3. Clasificación

De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer, las leucemias pueden clasificarse en agudas y crónicas, dependiendo del curso clínico de la enfermedad y de acuerdo con el linaje hematopoyético afectado, en mieloides y linfoides. Por lo tanto, las cuatro formas principales de Leucemia son: leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfóide aguda y leucemia linfóide crónica (Laskaris, 2006).

La leucemia aguda se presenta con evolución rápida y proliferación de células inmaduras que no desempeñan sus funciones normales; mientras la leucemia crónica es de evolución gradual lenta donde proliferan células en estadios maduros con capacidad de desempeñar algunas funciones normales (Cannobio, 2006).

La leucemia linfocítica aguda (LLA) involucra la producción y acumulación de una gran cantidad de linfocitos inmaduros denominados “linfoblastos” o “blastos”, además del bloqueo de la producción de células normales en la MO, lo cual lleva a una anemia y trombocitopenia. Algunos casos de LLA se han vinculado con una mutación que ocurre durante el período prenatal, por lo que este tipo de leucemia se diagnostica principalmente durante la niñez, pero en algunas ocasiones su incidencia aumenta especialmente entre los hombres mayores de 50 años, vinculado a la exposición a dosis altas de radiación (Hillard, 2008).

La leucemia mieloide aguda (LMA) involucra la acumulación de granulocitos inmaduros, eritrocitos y plaquetas. Estas células se producen rápidamente en médula y reemplazan a las células sanguíneas sanas de sangre periférica (SP). Los factores que promueven su desarrollo son la exposición a ciertos químicos (como el benceno); así como altas dosis de radiación y algunos trastornos genéticos poco comunes. Aunque la LMA puede aparecer a cualquier edad, el riesgo aumenta 10 veces en adultos mayores de 65 años (aproximadamente 1/10,000 personas) (Judith, 2007).

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es resultado del crecimiento descontrolado de linfocitos B, que se acumulan en la MO pero no impiden la producción de células sanguíneas normales como en la LLA. Se desconoce la razón por la cual se desarrolla este tipo de leucemia, pero generalmente es una enfermedad de adultos mayores (1/100,000 personas de 35 años de edad, a más de 30/100,000 de los 85 años en adelante) (Guy, 2004).

La leucemia mieloide crónica (LMC) se produce por una multiplicación descontrolada de granulocitos mientras las otras células continúan con sus funciones normales; lo cual explica por qué es menos grave. Este tipo de leucemia está asociada con la translocación t(9:22) en las células leucémicas conocida como cromosoma Filadelfia. La mayoría de los casos de LMC ocurre en adultos (1/100,000 personas alrededor de los 40 años, 2/100,000 a los 55 años hasta 1/10,000 personas a los 80 años de edad), pero los niños también pueden presentar la enfermedad (Cortes, 2006).

Se ha descrito un nuevo tipo de leucemia denominada leucemia agresiva de células NK, caracterizada por una proliferación sistémica de células NK de curso clínico agresivo. Se conoce poco acerca de la etiología de este tipo de leucemia, pero se sugiere un posible rol patogénico del virus de Epstein-Barr (EBV); ya que la mayoría de los casos contienen este virus en forma episomal. Esta forma de leucemia es más frecuente en asiáticos que occidentales, siendo predominante en adolescentes y adultos jóvenes, sin predilección por algún sexo. La mayoría de los casos tienen curso fulminante provocando la muerte en días o semanas de la presentación inicial y entre 1 a 2 años tras su diagnóstico (Chan, 2003).

1.4. Epidemiología

El concepto de enfermedades hemato-oncológicas designa un grupo de neoplasias generadas por alteraciones en el crecimiento, diferenciación y muerte de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) (OMS, 1995). Aun cuando estas enfermedades no ocupan los primeros lugares en morbilidad y mortalidad, tienen gran importancia debido a que las leucemias presentan una elevada incidencia causando la muerte de la población infantil y adulta joven. Este padecimiento es más frecuente en hombres (56%) que en mujeres y su incidencia varía de acuerdo a la edad y tipo de leucemia; el tipo más común es la leucemia aguda (75%) que afecta a niños menores de 15 años y a adultos mayores de 60; mientras la leucemia crónica (80%) usualmente ocurre después de los 20 años de edad y raramente se presenta durante la niñez. De esta manera, la LLA (77%) es la más frecuente en niños

(1/70,000 casos en adultos) y los adultos mayores de 60 años desarrollan con mayor frecuencia (80%) LMA (1/10,000 casos en niños), aunque la incidencia de la LLC (30%) y la LMC (15%) aumenta discretamente (1.3/100,000) en mayores de 20 años (WHO, 2010).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), durante el 2009 las principales causas de morbilidad en la población mexicana fueron los tumores malignos en órganos hematopoyéticos, principalmente leucemias (17.9%). Se indicó que en hombres la leucemia fue la enfermedad con mayor recurrencia (22.8%); mientras en las mujeres después del cáncer de mama representó la segunda causa de morbilidad (14.1%). Por otro lado, en la población infantil entre los 5 y 9 años se presentan las mayores tasas de leucemia, seguido por los niños de 0 a 4 años (INEGI, 2009).

En cuanto a la mortalidad por enfermedades hemato-oncológicas en México para este mismo año, el 55% de las muertes correspondieron a leucemias, siendo la de tipo linfoide la más frecuente (46%), seguida de la leucemia mieloide (33%). Por grupos de edad, ésta enfermedad presenta la mayor tasa de mortalidad observada en niños y jóvenes de 0 a 14 y 15 a 29 años; 2.7 y 2.6 por cada mil habitantes de cada grupo respectivamente (INEGI, 2009).

En relación a la distribución geográfica de las leucemias, las entidades federativas con mayores tasas de mortalidad corresponden a: Tabasco, Puebla, Distrito Federal, Baja California Sur, Nayarit, Yucatán, Michoacán, Tlaxcala y Jalisco (INEGI, 2009).

1.5. Tratamiento

El tratamiento de la leucemia es diferente para cada uno de los tipos, pero la terapéutica tiene el papel más importante y definitivo dentro del transcurso de esta enfermedad, ya que de este depende el desenlace de dicha patología. Generalmente el tratamiento para la LMA, LLA y LMC es realizado en dos etapas, la primera denominada etapa de inducción para matar a las células leucémicas de la médula y la segunda conocida como etapa de

consolidación para matar a cualquier célula leucémica restante que pueda estar presente en el cuerpo. El objetivo de la quimioterapia es la remisión del paciente, logrando índices de remisión completa en cerca del 98% de los niños y del 85% los adultos (Scheinger, 2004).

La quimioterapia que se proporciona en la fase de inducción se suministra de forma intravenosa y oral en combinación; también se puede administrar directamente en el líquido cefalorraquídeo mediante inyecciones en la espina dorsal (quimioterapia intratecal). Durante esta etapa se requiere de hospitalización y aislamiento del paciente, pues éste es vulnerable a infecciones además de necesitar transfusiones de sangre y plaquetas. En cambio, el tratamiento en la fase de consolidación se hace generalmente en el paciente ambulatorio e implica recibir inyecciones regulares del medicamento de quimioterapia durante varios meses y terapias con radiación de cuerpo entero en casos avanzados para matar a las células cancerosas que se encuentran en sitios “santuario” como sistema nervioso central o testículo (Diaconescu, 2004).

Las drogas quimioterapéuticas se asocian generalmente a efectos secundarios como: anemia por la eliminación de glóbulos rojos, alteraciones en la coagulación por la disminución de plaquetas, alopecia por daño a los folículos pilosos, diarrea o vómito por la transformación de las células del aparato gastrointestinal y riesgo creciente de infecciones por daño a los glóbulos blancos (Diaconescu, 2004).

A diferencia de las anteriores, el tratamiento estándar de pacientes con LLC en etapa temprana es una estrategia de vigilancia, realizando exámenes clínicos cada tres meses; ya que la quimioterapia solo se aconseja durante la enfermedad activa y sintomática para posteriormente realizar un TCPH que es actualmente el tratamiento curativo disponible para este tipo de leucemia (Scheinger, 2004).

Si la leucemia reaparece o el paciente no responde favorablemente a la quimioterapia, se recomienda un TCPH. Esta modalidad terapéutica puede restaurar la MO de los pacientes,

luego de un tratamiento intensivo de quimioterapia combinado con radioterapia. Antes de que el trasplante pueda ocurrir, el paciente recibe quimioterapia a altas dosis y radioterapia agresiva para destruir cualquier célula cancerosa en su cuerpo y entonces las células puedan ser trasplantadas. Los trasplantes tienen mejores resultados si el donador tiene compatibilidad inmuno-genética con la persona que está recibéndolo, generalmente un hermano u otro individuo genéticamente relacionado (Scheinger, 2004).

2. TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

2.1. Antecedentes

El trasplante de médula ósea (TMO) ha evolucionado a lo largo de un período de 50 años, donde las observaciones de laboratorio y estudios en animales han permitido definir los elementos esenciales de la biología del trasplante (Thomas, 1999). Se considera que el TMO tuvo sus inicios con *Brown* en 1891, cuando administraba a sus pacientes MO por vía oral, como tratamiento para desordenes hematológicos (Herzing, 1987). Posteriormente en 1939, *Osgood* y colaboradores la administraron a sus pacientes vía intramedular y endovenosa para el tratamiento de leucemias y aplasia medular, realizándose así el primer intento de recuperar la hematopoyesis mediante la administración de transfusiones y pequeñas cantidades de MO proveniente de un hermano, sin ningún tratamiento de acondicionamiento previo (Osgood, 1939).

Cuando se identificó que la aplasia celular producida por irradiación causaba la muerte de población japonesa expuesta a las radiaciones de bombas atómicas, se aceleraron las investigaciones relacionadas con la cantidad de irradiación corporal necesaria para provocar aplasia medular y se establecieron las bases para su aplicación clínica racional en el TMO. Para 1949 los estudios de *Jacobson et al.* mostraron que ratones sometidos a irradiación letal, podían recuperar su hematopoyesis normal si se protegía el bazo de

dichas radiaciones, demostrando el papel de este órgano en el sistema hematopoyético (Jacobson, 1949); mientras Lorenz y colaboradores en 1951, describieron que con la infusión de células de bazo o MO de otro ratón, se podían rescatar los ratones sometidos a irradiación letal (Lorenz, 1951).

Estos experimentos inicialmente parecían demostrar que la protección a las radiaciones era un fenómeno debido a factores humorales. Sin embargo, Barnes y Loutit en 1954, revisando sus propios experimentos y otros realizados con anterioridad, concluyeron que la hipótesis química debía ser reemplazada por la celular (Barnes, 1954). Un fuerte apoyo para esta hipótesis se produjo en 1955, cuando Main y Prehn informaron que ratones irradiados protegidos por una infusión de médula alogénica manifestaron tolerancia a un injerto de piel del donador (Main, 1955) y Ford *et al.* en 1956, demostraron que los ratones irradiados letalmente protegidos por una infusión de la MO posteriormente manifestaron características citogenéticas del donador (Ford, 1956).

Para el año de 1957, E. Donnall Thomas realizó el primer intento de trasplante alogénico de MO en humanos (Thomas, 1957), por lo que recibió el premio Nobel de Medicina en el año de 1990. Así, durante los años 60s se realizaron casi 200 trasplantes alogénicos de MO en pacientes con enfermedad hematológica grave aunque sin éxito a largo plazo, ya que se desconocía la importancia de la similitud en los antígenos de histocompatibilidad entre donador y receptor, además de la necesidad de recibir un tratamiento inmunosupresor intenso antes del trasplante.

Más tarde en el año de 1958, después de que Miescher y Fauconnet identificaran anticuerpos inducidos por transfusiones o embarazos que reaccionaban con antígenos presentes en los leucocitos humanos (Miescher, 1954), Dausset y Van Rood utilizaron estos anticuerpos para describir los que actualmente se conocen como antígenos leucocitarios humanos (HLA) (Dausset, Van Rood, 1958).

Durante esta época se obtuvieron resultados satisfactorios con el trasplante de gemelos idénticos, que sirvieron como base para el desarrollo de este procedimiento; pues en 1959 utilizando dosis letales de irradiación corporal total y MO de un gemelo idéntico, se trasplantaron dos pacientes con LLA avanzada que recuperaron la hematopoyesis en algunas semanas, pero murieron de enfermedad progresiva (Thomas, 1975).

Para 1965, Santos y Owens informaron que la ciclofosfamida era un potente inmunosupresor en modelos murinos (Santos, 1965) y como este medicamento era conocido por su efecto antileucémico, se administraron 60mg/kg durante 2 días antes de proporcionar una irradiación total corporal como un régimen inmunosupresor con el que se obtuvieron los primeros receptores con sobrevida a largo plazo (Thomas, 1977).

A finales de la década de los 60s, ya con un gran avance en el tratamiento basado en antibióticos y el conocimiento sobre agentes antineoplásicos efectivos, ocurrieron los primeros trasplantes alogénicos exitosos donde dos pacientes (uno que presentaba inmunodeficiencia congénita y otro con enfermedad de *Wiskott Aldrich*) sobrevivieron al procedimiento (Bach, 1968; Koning, 1969).

Los primeros trasplantes autólogos en humanos se realizaron en 1958 por Kurnick *et al.* y McGovern junto con sus colaboradores en 1959; donde tales implantes parecían proteger contra la toxicidad medular, pero su beneficio clínico era incierto debido a su ineffectividad en la erradicación de la enfermedad (Kurnick, 1958; McGovern, 1959). Este tipo de trasplante fue utilizado exitosamente primero en pacientes con linfomas en los años 70s, extendiéndose su uso por todo el mundo en la década de los 80s (Appelbaum, 1978).

En 1962, se inició el trasplante con SP cuando Goodman y Hodgson demostraron la existencia de CPH en la sangre de ratones (Goodman, 1962), que pudieron recolectarse de forma exitosa cuando comenzó a desarrollarse la tecnología de la centrifugación. Esta fuente de células se comenzó a utilizar en pacientes de los que no se podían obtener

progenitores medulares debido a su enfermedad de base o a irradiación previa, pero su uso se amplió después de descubrir que los factores de crecimiento hematopoyéticos causan una liberación transitoria de estas células a la SP. De esta forma, en 1981 se introdujo la sangre periférica movilizada (SPM) como fuente de CPH (Körbling, 1981).

La demostración de la presencia de CPH en sangre de cordón umbilical (SCU) sugirió el uso de estas células para la realización de trasplantes. Así, el primer trasplante con esta fuente lo realizaron *Gluckman* y colaboradores en el año de 1989 (Gluckman, 1997); sin embargo, el primer uso terapéutico fue reportado en 1970, con una joven de 16 años quien recibió ocho unidades de SCU de ocho donadores diferentes en un transcurso de 18 días; de las cuales solo una unidad injertó 38 días después del trasplante y la paciente se mantuvo en remisión completa tras el mantenimiento de la quimioterapia durante nueve meses postrasplante (Bandini, 2003).

Debido a la poca probabilidad de encontrar un donador familiar compatible, en los años 70s se realizaron los primeros trasplantes no relacionados (Speak, 1973); pero la heterogeneidad de los haplotipos HLA hizo necesaria la recolección de grandes paneles de donadores hasta la existencia hoy en día del registro internacional de donadores no emparentados, basado en la existencia de bancos de SCU y progenitores hematopoyéticos de donadores voluntarios (WHO, 2009).

Tras las primeras experiencias del TMO, este procedimiento comenzó su expansión en los años 70s para experimentar un desarrollo espectacular en las décadas 80 y 90. Actualmente el TCPH se ha expandido a un amplio grupo de modalidades terapéuticas al ampliar las fuentes de obtención de las CPH; así para el año 2003 se realizaron cerca de 30,000 trasplantes en el mundo, de ellos el 70% fueron autólogos y el 30% alogénicos, donde la SPM fue la fuente de progenitores hematopoyéticos en el 90% de los trasplantes autólogos y en el 30% de los alogénicos (Baron, 2005).

2.2. Generalidades del TCPH

El TCPH es un método utilizado para reemplazar la MO dañada o destruida por CPH sanas, estas células inmaduras colonizan la MO para promover la regeneración de una hematopoyesis normal (Thomas, 1995). Dentro de este procedimiento la persona que recibe los beneficios se conoce como receptor; mientras la persona de la cual procede el tejido se denomina donador (Hansen, 1997).

Antes del trasplante debe administrarse ya sea un tratamiento ablativo (mieloablativo) a base de dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia para destruir cualquier tipo de célula en la MO del paciente, lo que permite a las recientes células progenitoras alojarse en el hueco medular para originar nuevas células sanguíneas o un tratamiento de intensidad reducida (no mieloablativo) recibiendo dosis bajas de quimioterapia y radiación antes del trasplante, pues no es necesaria la destrucción total de la MO del receptor ya que la propia médula del donador es la que a través de la enfermedad de injerto contra hospedero (EICH) crea su propio espacio en la cavidad medular del receptor debidamente inmunosuprimido, siendo este efecto el responsable de la erradicación de la enfermedad (Giralt, 1997).

El TCPH es un procedimiento terapéutico de introducción relativamente reciente en la práctica clínica y por tal motivo sigue en plena evolución. Éste tiene tres objetivos: primero la sustitución de la hematopoyesis del paciente por ser total o parcialmente defectuosa; segundo permitir la recuperación hematopoyética de un paciente que ha recibido un tratamiento antineoplásico en dosis elevadas que origina mielosupresión prolongada o definitiva y tercero producir una reacción contra la enfermedad neoplásica a través de la celularidad inmunocompetente del injerto proveniente de un paciente sano, para lograr su eliminación (Barker, 2003).

Las bases para realizar el TCPH proceden de las siguientes observaciones clínicas: 1) la mayoría de las neoplasias hematológicas presentan una sensibilidad relacionada con la dosis de quimioterapia o radioterapia y 2) la toxicidad medular debida a la administración de dosis muy altas de quimioterapia o radioterapia, permite la infusión de células hematopoyéticas pluripotenciales que en otras circunstancias no sería posible (Russell, 1998).

Su eficacia se basa en la erradicación de las células tumorales mediante la administración de altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia previa a la infusión de progenitores hematopoyéticos sanos obtenidos de MO, SPM o SCU procedentes del mismo paciente o de un donador (Ljungman, 2009), que ejercen un efecto inmunomodulador sobre las células neoplásicas residuales (Perez-Simon, 2002).

Se ha demostrado que en el TCPH alogénico la ausencia de identidad inmunológica entre donador y receptor tiene tres consecuencias fundamentales como inmunoterapia:

1) Tras el trasplante, el receptor genera un ataque inmunológico contra el injerto, lo que puede originar su rechazo (Baron, 2005).

2) Las células inmunocompetentes infundidas con las CPH o las que se originan a partir de ellas, atacan a las células tumorales residuales dando lugar al Efecto Injerto contra Tumor (*Graft-versus-Leukaemia = GvL*); independientemente de los efectos de las altas dosis de quimioterapia (Remberger, 2002).

3) Las células inmunocompetentes en el injerto reaccionan contra las células normales de los tejidos del receptor lo que puede desencadenar la EICH (*Graft-versus-Host Disease = GvHD*), la cual debe ser controlada con inmunosupresores (Ferrara, 2009).

Finalmente con el TCPH se van a producir dos fenómenos alorreactivos: el establecimiento de quimerismo (al existir en el receptor del injerto células provenientes de dos individuos distintos) y la tolerancia postrasplante (Baron, 2006).

2.3. Tipos de TCPH

De acuerdo con la procedencia de las CPH existe:

- a) Trasplante de médula ósea (TMO): Los progenitores hematopoyéticos se obtienen por punciones repetidas de las crestas iliacas posteriores o anteriores.
- b) Trasplante de cordón umbilical (TCU): Las células se recogen por punción de la vena umbilical una vez concluido el parto y antes del alumbramiento.
- c) Trasplante de sangre periférica movilizada (TSPM): Las CPH se obtienen por aferesis después de la movilización de estas células de la MO con estimuladores de colonias de granulocitos (Rocha, 2008).

Dependiendo de la relación genética entre el donador y el receptor se pueden dividir en:

- a) Trasplante autólogo o autogénico (autotrasplante): Los progenitores son obtenidos del propio paciente con anterioridad al tratamiento antineoplásico, es decir, donador y receptor son la misma persona.
- b) Trasplante singénico o isogénico (isotrasplante): Dado entre gemelos idénticos o univitelinos, cuando donador y receptor son genéticamente idénticos.
- c) Homotrasplante o alotrasplante: Cuando el donador y el receptor pertenecen a la misma especie, pero son genéticamente diferentes. Este tipo de trasplante puede subclasificarse de acuerdo con el origen del donador en:
 - 1. Trasplante alogénico de donador relacionado; donde el donador es un familiar HLA idéntico.
 - 2. Trasplante alogénico de donador no relacionado; donde el donador no pertenece a la familia del receptor pero presenta compatibilidad en antígenos HLA.
- d) Heterotrasplante o xenotrasplante: Dado entre individuos de diferentes especies (Urbano-Ispizua, 2007).

2.4. Fuentes de obtención de las CPH

Las células progenitoras pluripotentes tienen dos características especiales: son capaces de transformarse en células especializadas para cualquier órgano o tejido del cuerpo y pueden producir más células idénticas a ellas, es decir, nuevas células progenitoras con exactamente las mismas propiedades. Así, algunas células progenitoras comienzan a madurar convirtiéndose en diferentes tipos celulares especializados con tareas y funciones bien definidas; pero al mismo tiempo, otras continúan produciendo más células progenitoras de manera que las reservas no se agoten (Cutler, 2001).

El sistema hematopoyético depende fundamentalmente de la existencia de estas células progenitoras para mantener la producción de células sanguíneas maduras. Por lo tanto, la hematopoyesis, es un proceso en el que las células progenitoras pluripotenciales hematopoyéticas proliferan o se diferencian de forma ordenada y controlada para generar nuevas células progenitoras o transformarse en células precursoras y maduras de diverso linaje hematopoyético (Verfaillie, 2000).

Las CPH expresan una proteína de superficie característica llamada antígeno CD34 que es de gran utilidad para reconocerlas y aislarlas de sus diferentes fuentes de obtención (Cutler, 2001).

a) Médula Ósea

La mayoría de las CPH residen en la MO, que ha sido tradicionalmente la fuente principal de estas células para el trasplante alogénico o autólogo. Para su obtención al donador adulto (o al paciente en el caso de un autotrasplante) se le practican punciones aspirativas en las crestas ilíacas bajo anestesia general o raquídea, con las que se obtiene sangre medular con un contenido de $1.5-3.5 \times 10^8$ células/Kg del receptor; mientras en el donador

pediátrico se debe obtener una muestra de 10 a 20 ml/Kg del receptor (Fagundo, 2004). Esta cantidad representa el 1-5% del volumen total de la médula, sin producir una alteración de los recuentos de leucocitos o plaquetas en el donador y se estima que esta fuente de progenitores proporciona unas 3×10^6 células/Kg del paciente (Barker, 2002).

A medida que se extrae la MO ésta se deposita en un medio heparinizado y se pasa a través de filtros (200 a 300nm) para que los grumos medulares se conviertan en suspensiones celulares y se eliminen las esquirlas óseas. En el TMO alogénico esta sangre medular se transfunde 24 horas después de finalizado el régimen de acondicionamiento; mientras que en el TMO autólogo, la sangre medular se criopreserva hasta el momento de la transfusión (Fagundo, 2004). Las células progenitoras infundidas son capaces de llegar o regresar a la médula en un día, donde las moléculas de adhesión son importantes en el anidamiento celular (Simmons, 1994).

b) Sangre periférica

Las CPH circulan por la SP en cantidades extremadamente bajas ($0.5-5 \text{ CD34}^+/\mu\text{l}$); sin embargo, estas células pueden mobilizarse después de la administración de factores estimulantes de colonias (G-CSF, GM-CSF) o quimioterapia con agentes de baja toxicidad (ciclofosfamida, etopósido) sobre las CPH a largo plazo, con lo que se observa un aumento dependiente del tiempo de éstas células en SP, las cuales se recolectan mediante procedimientos de aféresis con el objetivo de obtener un recuento concreto de células mononucleares o una dosis de $\text{CD34}^+/\text{Kg}$ (Cutler, 2001). El régimen de movilización más habitual incluye la administración de G-CSF a $10 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$, seguido de una aféresis al cuarto y quinto día (Russell, 1998). El número preciso varía según el centro y tipo de trasplante, una media sería de $2-8 \times 10^6 \text{ CD34}^+/\text{Kg}$ del receptor aunque algunos estudios sugieren que dosis mayores ($5 \times 10^6 \text{ CD34}^+/\text{Kg}$) injertan más rápidamente (Cutler, 2001).

Aunque se ha propuesto que las CPH de SP se encuentran en un estado más diferenciado que las de MO, han demostrado una ventaja significativa en términos de rapidez de injerto, pues su capacidad de implante es mayor que el de los progenitores de MO dando lugar a una reconstitución hematopoyética más rápida que la que se observa después de un TMO; lo cual reduce la morbilidad y mortalidad del trasplante. Además en el trasplante autólogo, las CPH de SP presentan una ventaja más respecto a las de la MO por presentar menos contaminación de células tumorales (Waters, 1998).

c) Cordón umbilical

Actualmente, la SCU es la segunda fuente de CPH en niños y la tercera para trasplante en adultos que se ha utilizado en pacientes relacionados y no relacionados con compatibilidad total o parcial (Moscardó, 2004).

La falta de donadores HLA idénticos y el hecho de que la incidencia de la EICH aumente con la disparidad en los antígenos leucocitarios humanos entre donador y receptor limitan la aplicación clínica del trasplante. Por esta razón, la SCU como fuente de CPH ha representado un avance significativo dentro del trasplante alogénico en el que la probabilidad de obtener un producto HLA idéntico de un hermano o pariente es de sólo el 30% y de un donador no relacionado es del 50-70%, esto calculado entre un "pool" potencial de 7 millones de donadores voluntarios en el mundo (Brown, 2008). Además en los Estados Unidos el tiempo promedio requerido para encontrar un donador no relacionado HLA compatible a partir de MO es de 49 días; mientras para SCU es de 19 días (Barker, 2002).

La SCU se extrae poco después del parto y se prepara una concentración celular que se logra agregando reactivos que ayudan a sedimentar los glóbulos rojos para poder separar el plasma que se somete a centrifugación diferencial para obtener los progenitores hematopoyéticos, cuyo recuento se realiza mediante citometría de flujo tras marcar los antígenos CD34 y CD45 presentes en las CPH (Fagundo, 2004).

Generalmente, una unidad de SCU suele contener $1-8 \times 10^6$ células $CD34^+$ /ml, ésta dosis limitada de CPH (10 veces menos células que en MO y 100 veces menos que en SPM) tiene la capacidad de producir un buen implante en niños y adultos con menos de 40 Kg; pues en adultos con mayor peso el número de células es muy pequeño para promover un implante duradero. Con el objetivo de aumentar el número de células, se utilizan múltiples cordones umbilicales para lograr el injerto después de un acondicionamiento intenso, el cual ocurre más rápido que cuando se usa un cordón umbilical (Moscardó, 2004).

Las células de cordón presentan una reactividad inmunológica reducida debido a que son muy inmaduras pues no tienen casi marcas específicas del individuo nacido, por lo que soportan tolerancias de uno o dos antígenos leucocitarios sin coincidencia, disminuyendo la incidencia y severidad de la EICH aguda (Rocha, 2001). Comparadas con las CPH adultas, las células progenitoras de SCU tienen menor capacidad proliferativa y de autorrenovación; ya que las células $CD34^+$ derivadas de SCU son capaces de generar gran cantidad de células maduras en cultivo sin reducir el número de células $CD34^+$ en el mismo; mientras que las células $CD34^+$ de MO disminuyen en el cultivo a medida que producen células maduras, lo cual indica que las células primitivas que provienen de la MO pierden su capacidad de autorrenovación (Kim, 1999). Además, existe una alteración significativa en el número de citocinas y linfocinas hematopoyéticas en la SCU (tales como G-CSF, GM-CSF e IL-3) en comparación con la SPM del adulto, lo que provoca una demora en la recuperación hematológica e inmune después del trasplante (Broxmeyer, 1992).

Las dosis de células trasplantadas varía según el receptor (adulto o pediátrico); siendo de $1.6-1.7 \times 10^7$ células nucleadas/Kg en adultos y $0.24-0.37 \times 10^8$ células nucleadas/Kg en pacientes pediátricos (Rocha, 2001). La elección de la fuente de progenitores para un trasplante es decisión del equipo clínico, con base en la urgencia del trasplante y en los resultados previos para cada patología con las diferentes fuentes de CPH. En el caso del trasplante autólogo, el 90% de los trasplantes se realizan a partir de CPH de SP; mientras

en el trasplante alogénico, la fuente de progenitores depende de la disponibilidad de un donador relacionado HLA idéntico, pues al no contar con él se origina la búsqueda en bancos de SCU (con dosis $>2 \times 10^7$ células nucleadas/Kg y 1-2 disparidades HLA-A, B o DR) y registros de donadores de MO (HLA-idéntico en A, B, C, DR y DQ con 10/10 o 9/10) para realizar el trasplante (Barker, 2003).

2.5. Criterio genético para un TCPH.

El criterio más importante para la selección de un donador es la compatibilidad de los antígenos HLA entre receptor y donador para garantizar la sobrevida del injerto (Loiseau, 2007). Desde 1996 se sabe la importancia de la tipificación de alta resolución para determinar los alelos HLA, pero la importancia de la compatibilidad de HLA-DP para un buen resultado del TCPH ha sido recientemente descrita (Petersdorf, 2001).

Sin embargo, aun cuando el paciente y el donador son idénticos para los alelos HLA-A, B, C, DR, DQ y DP suele desarrollarse la EICH, por lo cual se han estudiado otros factores que pueden contribuir a la incidencia de esta complicación como las diferencias funcionales y estructurales del repertorio de los receptores sobre las células NK entre donador y receptor (Valiante, 1997).

3. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HOSPEDERO

3.1. Generalidades de la EICH

En la actualidad, el rechazo del injerto por parte del receptor es raro, pero la reacción de las células injertadas contra el receptor es mucho más frecuente, presentándose en el 40-50% de los pacientes con TMO alogénico; mientras su incidencia luego de un trasplante de un órgano sólido es menos común. Por lo tanto, la principal complicación derivada del

trasplante alogénico responsable de la elevada morbilidad y mortalidad que se observa tras este procedimiento, es la EICH (Ferrara, 2009). Para que se produzca esta enfermedad el injerto debe contener células inmunocompetentes, el hospedero debe poseer aloantígenos que no posee el injerto y finalmente el hospedero debe estar inmunocomprometido (Toubai, 2008).

La EICH se da tras reconocer como extraños los antígenos de histocompatibilidad sobre tejidos del receptor por el sistema inmunitario procedente del donador; esto da como resultado la agresión de distintos órganos blanco del paciente por parte de células efectoras estimuladas del injerto con la participación de diversas citocinas, lo que produce una actividad citolítica destructiva contra los tejidos del receptor cuando éste es inmunoincompetente. Todo esto aunado a diversas infecciones y regímenes de acondicionamiento que dan lugar a cambios pro-inflamatorios sustanciales en las células endoteliales y epiteliales, originan que las células del donador se encuentren en un ambiente extraño y alterado; favoreciendo la activación y proliferación de células inflamatorias (Schetelig, 2005).

La sobrevida en un trasplante alogénico está directamente relacionada con el grado de compatibilidad HLA; así después de un trasplante alogénico óptimo (donador hermano con HLA idéntico y receptor con quimioprofilaxis) el riesgo de desarrollar un grado II a IV de EICH es del 40-50%, pero la incidencia aumenta a un 60% con disparidad de un antígeno HLA y al 75-90% con disparidad de dos o tres antígenos respectivamente (Ferrara, 2006).

3.2. Factores de riesgo para el desarrollo de la EICH

Se han identificado varios factores de riesgo descritos en el **Cuadro 1** asociados con el desarrollo de la EICH (Atkinson, 1990).

Cuadro 1: Factores de riesgo para el desarrollo de EICH.	
Dependientes del donador	Donador no emparentado
	Donador parcialmente compatible
	Donador con alosensibilización previa (transfusiones, embarazos)
	Donador mujer para receptor varón
	Donador con mayor edad
	Donador CMV positivo
Dependientes del receptor	Paciente de mayor edad
	Paciente CMV positivo
	Paciente esplenectomizado (EICHc)
Dependientes del procedimiento	Acondicionamiento intensivo
	Profilaxis de EICH menos intensiva
	Ausencia de profilaxis antibacteriana
Dependientes del injerto (inóculo)	Empleo de progenitores de sangre hematopoyética
	Mayor cantidad de linfocitos T (CD3 ⁺)
	Menor cantidad de células progenitoras (CD34 ⁺)
Dependientes de las complicaciones	Antecedentes de EICH aguda (EICHa)
	Infección

3.3. Tipos de EICH y manifestaciones clínicas

De acuerdo con la secuencia temporal de aparición hay dos formas de EICH: enfermedad injerto contra hospedero aguda (EICHa) y crónica (EICHc). La EICHa es aquella que ocurre en la fase precoz postrasplante alogénico, clásicamente antes del día +90 (Perez-Simon, 2005) tras el reconocimiento de antígenos mayores de histocompatibilidad específicos en las células del receptor (Loiseau, 2007) y la EICHc es aquella que se desarrolla en una fase tardía a partir del día +90 (Perez-Simon, 2005) donde factores genéticos como: antígenos menores de histocompatibilidad (Goulmy, 1996), citocinas pro-inflamatorias (Markey, 2008), moléculas de adhesión (Behar, 1996), enzimas implicadas en el metabolismo de drogas (Kim, 2006) o genes de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (Ruggeri, 2002) pueden favorecer la aparición de este tipo de EICH.

3.3.1. EICH aguda

La EICHa suele iniciarse entre los días +10 y +50, aunque puede tener inicio precoz o tardío. Su incidencia oscila entre un 30-60% en los receptores de CPH provenientes de hermanos HLA idénticos y en un 80% cuando los donadores son HLA idénticos no emparentados (Auletta, 2009).

Los órganos blanco de la EICHa son fundamentalmente la piel, el hígado y el aparato digestivo, pero se pueden ver afectados uno o varios de ellos con mayor o menor intensidad. Clínicamente esta enfermedad comienza con prurito o salpullido doloroso a la presión con posteriores lesiones cutáneas de varios tipos, seguido de manifestaciones extracutáneas que surgen como consecuencia del daño a los epitelios del tubo digestivo y los conductos biliares intrahepáticos (Couriel, 2004). Este padecimiento se caracteriza por dermatitis, elevación de pruebas hepáticas (bilirrubina, TGO, TGP y fosfatasa alcalina) con patrón colestásico y enteritis comprometiendo el intestino (en especial íleon distal y colon, menos frecuentemente esófago y estómago), refiriendo diarrea, náusea, vómito, fiebre, dolor abdominal tipo cólico y hemorragia digestiva baja; en un plazo menor a 100 días después del trasplante (Messina, 2008).

La EICHa se clasifica en cuatro estadios cuyo pronóstico está directamente relacionado con la gravedad y la extensión del compromiso cutáneo: *a)* Grado I: la superficie cutánea afectada no supera el 25% de la superficie total, *b)* Grado II: el compromiso es del 25 al 50%, *c)* Grado III: afección mayor del 50% y *d)* Grado IV: daño cutáneo con vesículas y ampollas (Ferrara, 2009).

Las moléculas efectoras que intervienen en la EICHa son el TNF- α como citocina inflamatoria, la IL-1, IL-6 e IL-8; todo a través de células T que reconocen aloantígenos más que por linfocitos autorreactivos como ocurriría en la EICHc (Perez-Simon, 2005).

3.3.2. EICH crónica

La EICHc presenta una mayor incidencia entorno al día +180; sin embargo, puede aparecer en cualquier momento desde el día +70 hasta años después del trasplante. Su mediana de aparición es de 201 días tras el trasplante en caso de donador relacionado HLA idéntico, 159 días con un donador no relacionado HLA idéntico y 133 días si es un donador no relacionado con alguna disparidad HLA (Filipovich, 2005). Su incidencia oscila entre el 30-80% de los trasplantes alogénicos y el riesgo de desarrollar este padecimiento aumenta con la gravedad de la EICHa (Pavletic, 2005).

Esta enfermedad suele originarse sin EICHa previa (*de novo*) en el 30%, pero también puede estar precedida de EICHa; ya sea tras un intervalo de latencia libre de enfermedad, luego de la resolución de un episodio agudo previo (*forma quiescente*) en el 36% o como evolución de una EICHa por extensión del cuadro sin solución y de continuidad (*forma progresiva*) en el 32% (Akpek, 2003).

En la EICHc se ven afectados varios de los múltiples órganos blanco, cada uno de ellos con mayor o menor gravedad. Clínicamente se caracteriza por manifestaciones que se parecen a las observadas en las enfermedades autoinmunes. Se presentan síntomas oculares (irritación, fotofobia, xeroftalmia), síntomas orales y gastrointestinales (xerostomía, disfagia, odinofagia), síntomas respiratorios (disnea, bronquiolitis obstructiva), alteraciones neuromusculares (debilidad, dolor muscular, pérdida de peso); además de daños cutáneos de tipo liquenoide (más frecuente y precoz) o esclerodermiforme (menos frecuente y tardía) (Mattson, 2007).

De acuerdo a su extensión, la EICHc se clasifica en localizada (limitada) con daño exclusivamente hepático y cutáneo limitado o generalizada (extensiva) con afección cutánea extendida y daño en múltiples órganos con peor pronóstico (Pérez-Simón, 2006).

En esta enfermedad a cada órgano se le asigna una puntuación de 0 a 3 según el grado de severidad de la afectación; de manera que la EICHc se divide en *leve*: afectación de uno o dos órganos (excepto el pulmón) con una puntuación máxima de 1, *moderada*: tres o más órganos afectados con una puntuación máxima de 1 o siempre que un órgano tenga una puntuación de 2 salvo el pulmón en el que es suficiente una puntuación de 1 y *grave*: cuando al menos un órgano alcanza una puntuación de 3 o bien el pulmón presenta una puntuación de 2. Mientras que los tipos moderado y grave requieren de un tratamiento inmunosupresor sistémico, el leve puede manejarse a través de un tratamiento tópico (Ratanatharathorn, 2001).

Por el contrario a la EICHa, en el desarrollo de la EICHa se producen aumentos inusuales de citocinas como la IL-4 e IFN- γ , en ausencia de IL-2; todo a través de linfocitos autorreactivos más que por células T que reconocen aloantígenos como ocurre en la EICHa (Perez-Simon, 2005).

4. CELULAS NK

4.1. Generalidades de las células NK

Las células asesinas naturales (NK=*Natural Killer cell*) son la tercera población de linfocitos, que pertenecen al linaje de células linfoides efectoras definidas por su fenotipo de superficie celular CD3⁻, CD56⁺ que representan del 5-25% de la fracción de células mononucleares de SP en humanos (Vivier, 2011).

En comparación con los linfocitos T y B, morfológicamente las células NK son linfocitos grandes que comparten varias características con los linfocitos CD8⁺ (CTL); pues contienen gránulos citolíticos preformados con granzimas y perforinas, así como una cantidad

exponencial de transcritos expresados constitutivamente para IFN- γ y ciertas citocinas que activan otros tipos de células del sistema inmune (Colucci, 2003).

Las células NK son diferentes a los linfocitos B y T; ya que no tienen completamente desarrollado el complejo de TCR, pero en forma similar a los linfocitos T citotóxicos expresan CD2, CD7, CD8, CD56, CD57 y con frecuencia CD16 que raramente se expresa en células T; de esta manera su fenotipo característico en reposo es: TCR $^-$, BCR $^-$, CD3 $^-$, CD16 $^+$, CD56 $^+$ (Cooper, 2001).

De acuerdo al nivel de expresión de la molécula de adhesión CD56, dos subconjuntos de células NK se han distinguido en SP humana. Más del 90% pertenecen al subconjunto CD56 dim que expresa altos niveles de CD16 y receptores KIR, representando el tipo de células NK más diferenciadas y maduras que tienen una capacidad superior de citotoxicidad; mientras el 10% restante son del fenotipo CD56 bright (CD16 $^-$, KIR $^+/-$) que tienen una mayor capacidad de producir citocinas proinflamatorias (Jacobs, 2001) y son el subconjunto de células NK dominantes en ganglios linfáticos humanos que interactúan con células dendríticas (Fehniger, 2003; Cooper, 2004).

4.2. Función de las células NK

Las células NK juegan un papel importante dentro de la respuesta inmune innata; ya que su función principal es proporcionar la primera línea de defensa para responder ante la infección y transformación tumoral sin sensibilización previa, a través de su capacidad de lisis celular; mediante citotoxicidad natural o dependiente de anticuerpos y la secreción de citocinas al medio (Smyth, 2002; Lee, 2007).

Estas células están diseñadas para detectar y eliminar células blanco induciendo en ellas muerte celular a través de dos vías diferentes que requieren de contacto entre células NK y célula blanco. La primera de estas vías involucra el reconocimiento de los receptores de

muerte celular por su ligando (Fas/FasL) que induce apoptosis (muerte celular programada) activando caspasas pro-apoptóticas. La segunda de las vías se efectúa a través de la reacción cruzada anticuerpo-receptor, el cual involucra un mecanismo de destrucción celular relacionado a exocitosis de gránulos citoplasmáticos produciendo necrosis y apoptosis; ya que el contenido tóxico de sus vesículas otorga un fuerte estímulo a la activación de caspasas (Leibson, 1997).

Se ha demostrado la existencia de dos subtipos de células NK: NK1 y NK2 que secretan diferentes patrones de citocinas (NK1 expresión de IFN- γ y NK2 de IL-5), lo que sugiere un posible papel diferencial en la respuesta inmunológica (Peritt, 1999).

Informes recientes describen que durante el embarazo, ciertos subconjuntos de células NK contribuyen al éxito del implante y función de la placenta, a través de la secreción de factores de angiogénesis como el factor de crecimiento endotelial vascular (Manaster, 2008); Y que los tejidos linfoides asociados a intestino, albergan un subconjunto único de células NK que se especializa en la producción de IL-22; una citocina proinflamatoria que media la defensa del hospedero frente a patógenos extracelulares (Colonna, 2009). Lo anterior indica que las células NK son una población celular heterogénea implicada tanto en el éxito del embarazo como en la respuesta inmune innata y adaptativa que en conjunto promueven la salud y supervivencia humana.

4.3. Receptores de las células NK

Las células NK tienen un reconocimiento complejo y altamente específico de las células blanco que está regulado por un sistema de receptores mediante la integración de señales de activación o inhibición, las cuales dirigen la citotoxicidad y la secreción de citocinas (Lanier, 2003; Bryceson, 2008).

A diferencia de los linfocitos B y T, las células NK no expresan receptores que requieren rearrreglo de genes somáticos para generar diversidad y especificidad de receptores; sólo expresan un arreglo de receptores codificados por una línea germinal que tienen funciones activadoras e inhibidoras (Lanier, 2008). Además, estos receptores se expresan estocásticamente sobre la superficie celular en combinaciones variadas de receptores activadores e inhibidores, resultando en muchos subtipos de células NK funcionalmente distintas (Valiante, 1997).

Adicionalmente a la regulación mediada por la unión ligando receptor, el potencial lítico de las células NK y su habilidad para producir IFN- γ es potenciada por interferones tipo I (IFN- α y IFN- β), IL-2, IL-8 e IL-15 secretadas por células dendríticas, macrófagos y tejido infectado por patógenos (Biron, 2001).

Las células NK circulan en un estado en el que espontáneamente pueden iniciar su función efectora, pero para prevenir la autoreactividad éstas células expresan un arreglo de receptores inhibidores que reconocen moléculas HLA clase I propias. Una expresión abundante de cuatro distintas moléculas de clase I (HLA-A, -B, -C y -E) sobre las células sanas provee de ligandos para la gran variedad de receptores inhibidores de las células NK haciéndolas resistentes a su ataque. Una baja regulación de la expresión durante ciertas infecciones virales, transformaciones neoplásicas u otras formas de estrés, reduce la inhibición de las células NK permitiéndoles eliminar a las células enfermas (**Fig. 1a**); fenómeno descrito como la hipótesis del *"missing self"* o pérdida de lo propio (Ljunggren, 1990).

Además de este mecanismo, la expresión de ligandos para receptores activadores sobre la superficie de la célula blanco puede contribuir al ataque de la célula NK (**Fig. 1b**). Los ligandos identificados para receptores activadores pueden ser moléculas propias inducidas que estructuralmente están relacionadas con las moléculas HLA de clase I (MICA, MICB o ULBP), propias alteradas (moléculas HLA de clase I cargadas con péptidos extraños) o no propias codificadas por patógenos (Rajalingam, 2012).

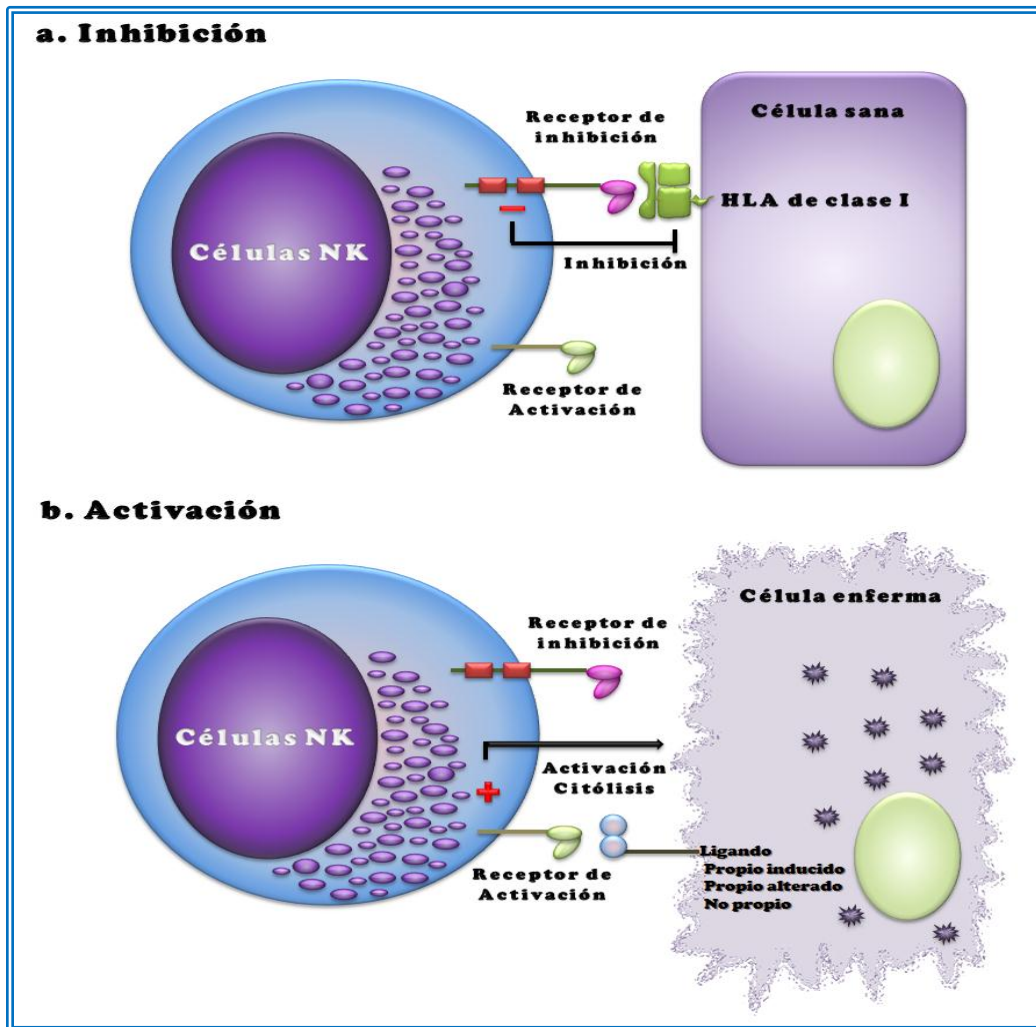


Figura 1. Respuesta de las células NK contra células sanas y enfermas [Modificado de Rajalingam, 2012, *Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice, Methods in Molecular Biology*. 882:391-414].

Este proceso de regulación de la actividad de las células NK fue descrito en 1990 por *Ljunggren y Kärre*; el cual sugiere que las células NK eliminan a células que pierden o presentan una baja expresión de moléculas HLA de clase I propias (*Ljunggren, 1990*). Se han definido receptores que permiten la activación de las células NK poniendo en marcha la maquinaria citotóxica de estas células; sin embargo, la mayor especificidad en el reconocimiento de la célula blanco proviene de los receptores de inhibición de las células NK, caracterizados por interactuar con diversos tipos de moléculas HLA de clase I para transmitir una señal de inhibición de la citotoxicidad que rige sobre la de activación. Esto quiere decir que si se enfrentan simultáneamente receptores de activación e inhibición, la respuesta es inhibición de la citotoxicidad (*Lanier, 1998*).

Existen dos grandes familias de receptores sobre la célula NK: 1) los receptores de tipo lectina, cuyo principal exponente es el heterodímero CD94/NKG2A y 2) los receptores de la súper familia de las inmunoglobulinas denominados KIR (McQueen, 2002).

5. RECEPTORES KIR

5.1. Organización genómica y génica de KIR

Los genes *KIR* (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*) forman parte de 100-200 Kb del complejo de receptores para leucocitos (*LRC=Leukocyte Receptor Complex*), ubicado en el cromosoma 19q13.4 (Fig. 2). El LRC constituye un largo (1 Mb) y denso conjunto de genes inmunes que codifican moléculas de superficie celular con los dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina distintivos (Uhrberg, 1997).

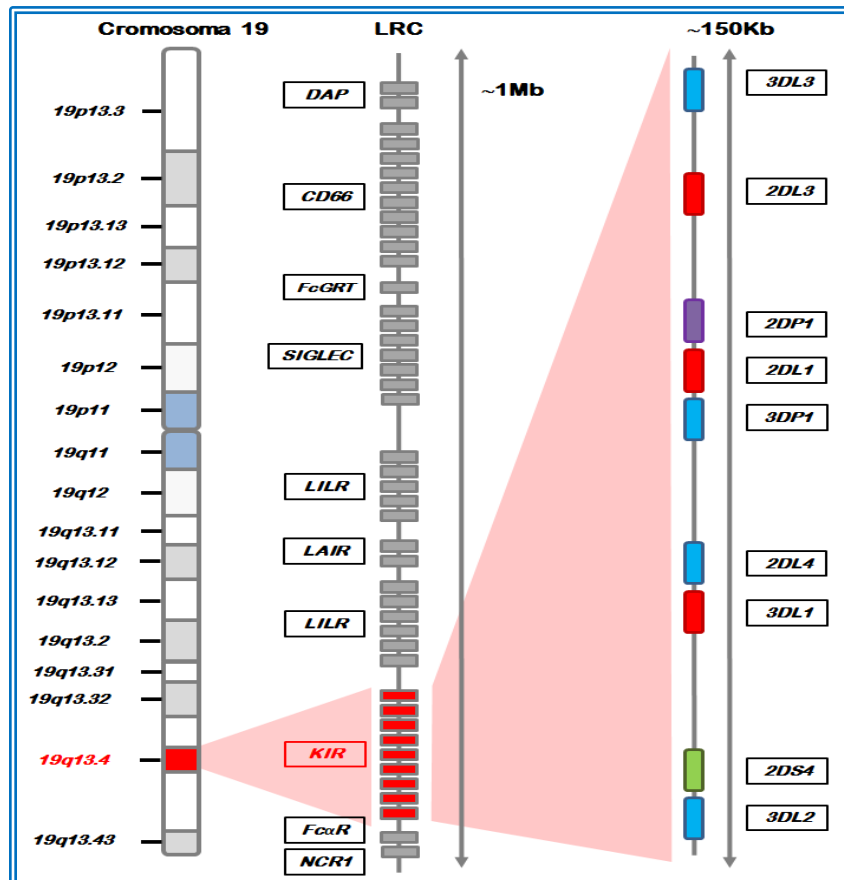


Figura 2. Organización genómica de los receptores KIR [Modificado de <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>, 2013].

Actualmente, la familia de genes *KIR* consta de 15 *loci* (KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 y KIR3DP1), que codifican para glicoproteínas de membrana denominadas receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (Uhrberg, 1997).

La secuencia genómica completa de los genes *KIR* varían en longitud de 4-16 kb y su estructura génica está organizada en 9 exones que codifican para diferentes unidades funcionales de la proteína (**Fig. 3**). Los exones 1 y 2 codifican la secuencia líder, cada uno de los exones 3, 4 y 5 codifican para uno de los tres dominios extracelulares de la proteína; estos dominios están unidos mediante un tallo codificado por el exón 6 a la región transmembranal codificada por el exón 7 y a la cola citoplásmica codificada por el exón 8 y 9 (Martin, 2000).

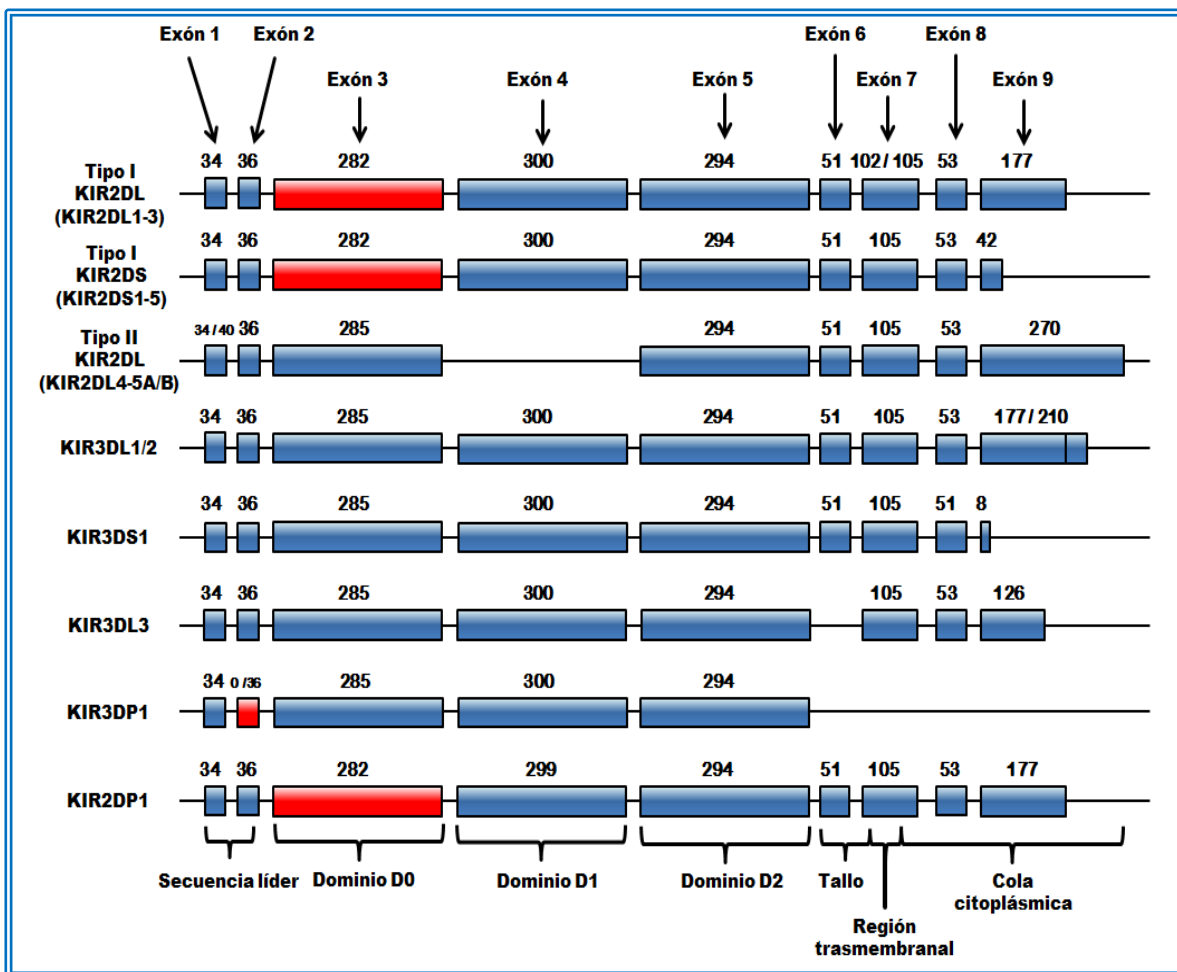


Figura 3. Estructura génica de KIR [Modificado de <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>, 2013].

Los genes *KIR* se han agrupado de acuerdo a su organización estructural en tres grupos diferentes:

1) Los genes *KIR2D* de tipo I que incluyen el pseudogen *KIR2DP1*, así como los genes *KIR2DL1-3* y *KIR2DS1-5*, poseen ocho exones, así como una secuencia de pseudoexón 3 (Wagtmann, 1995). Este pseudoexón se inactiva en los *KIR2D* de tipo I, algunas veces debido a una sustitución de nucleótidos localizada en un sitio de empalme entre el intrón 2 y el exón 3, donde su secuencia de nucleótidos exhibe un alto grado de identidad a la secuencia del exón 3 de *KIR3D* y posee una delección característica de tres pb o en otros casos, por un codón de paro prematuro que inicia un corte y empalme diferencial en el exón 3 (Vilches, 2000a). Dentro de este grupo de genes, *KIR2DL1* y *KIR2DL2* comparten una delección común en el exón 7 que los distingue del resto de los genes *KIR*, lo que se traduce en una secuencia más corta de dicho exón. Por otro lado, los genes *KIR2DL1-3* difieren de *KIR2DS1-5* únicamente en la longitud de la región que codifica la cola citoplasmática en el exón 9 y la estructura del pseudogen *KIR2DP1* es diferente de *KIR2DL1-3* en que el primero tiene una secuencia más corta del exón 4, debido a la delección de un solo par de bases (Vilches, 2000b).

2) Los genes *KIR2D* de tipo II que engloban *KIR2DL4* y *KIR2DL5*. característicamente han suprimido la región correspondiente al exón 4 presente en el resto de los genes *KIR*. Además, difieren de los genes *KIR2D* de tipo I en que los primeros poseen un exón 3 traducible; mientras que los genes *KIR2D* de tipo II tienen un pseudoexon 3 con una secuencia no traducible en su lugar (Selvakumar, 1996, Vilches, 2000d). *KIR2DL4* se diferencia de *KIR2DL5* (así como de otros genes *KIR*) por la longitud de la secuencia del exón 1, pues *KIR2DL4* es seis nucleótidos más largo y posee un codón de inicio diferente al de los otros genes *KIR*. Este codón de inicio está mejor relacionado con la secuencia consenso de inicio de la transcripción “Kozak” que es el segundo codón de inicio potencial en *KIR2DL4* que corresponde al codón de inicio presente en otros genes *KIR* (Vilches, 2000c; Vilches, 2000d).

3) Los genes *KIR3D* poseen nueve exones e incluyen a *KIR3DL1*, *KIR3DS1*, *KIR3DL2* y *KIR3DL3*. Los cuatro genes *KIR* difieren en la longitud de la región que codifica la cola citoplasmática en el exón 9 (Dohring, 1996). La secuencia genómica completa de *KIR3DL2* es la más larga de todos los genes *KIR* que abarca 16,256 pb y 1,368 pb de cDNA. Además, *KIR3DS1* difiere de *KIR3DL1* o *KIR3DL2* en que tiene una secuencia más corta del exón 8. *KIR3DL3* es diferente a otras secuencias *KIR* debido a que carece completamente el exón 6 (Torkar, 1998). La diferencia más extrema en la estructura de genes *KIR* se observó en *KIR3DP1* que carece por completo de los exones 6 a 9 y de vez en cuando también del exón 2. Las porciones restantes del gen que están presentes (exón 1, 3, 4 y 5) comparten un alto grado de identidad con otras secuencias de *KIR3D*, en particular con las secuencias de *KIR3DL3* (Gómez-Lozano, 2005).

5.2. Estructura molecular de las proteínas KIR

Los receptores *KIR* son proteínas transmembranales de tipo I que poseen dominios de tipo inmunoglobulina característicos en sus regiones extracelulares, localizadas sobre la superficie celular de células *NK* maduras (Fig 4), cuyos dominios extracelulares son los responsables del reconocimiento de la célula blanco (Vilches, 2002).

De acuerdo con el número de dominios extracelulares, las proteínas *KIR* pueden tener dos o tres dominios de tipo inmunoglobulina (*KIR2D* o *KIR3D*); así los receptores *KIR2D* presentan dos dominios tipo inmunoglobulina y los *KIR3D* exhiben tres dominios (D0, D1 y D2). Las proteínas *KIR* con dos dominios se dividen en dos grupos en función del origen del dominio distal de tipo inmunoglobulina presente en la membrana. Las proteínas *KIR2D* de tipo I (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4* y *KIR2DS5*) poseen un dominio distal de tipo inmunoglobulina D1 codificado por el exón 4, pero perdieron el dominio D0 debido a la eliminación del exón 3; mientras las proteínas *KIR2D* de tipo II (*KIR2DL4* y *KIR2DL5*) poseen un dominio distal de tipo inmunoglobulina D0 sin embargo le falta el dominio D1 por la pérdida del exón 4 (Wagtmann, 1997).

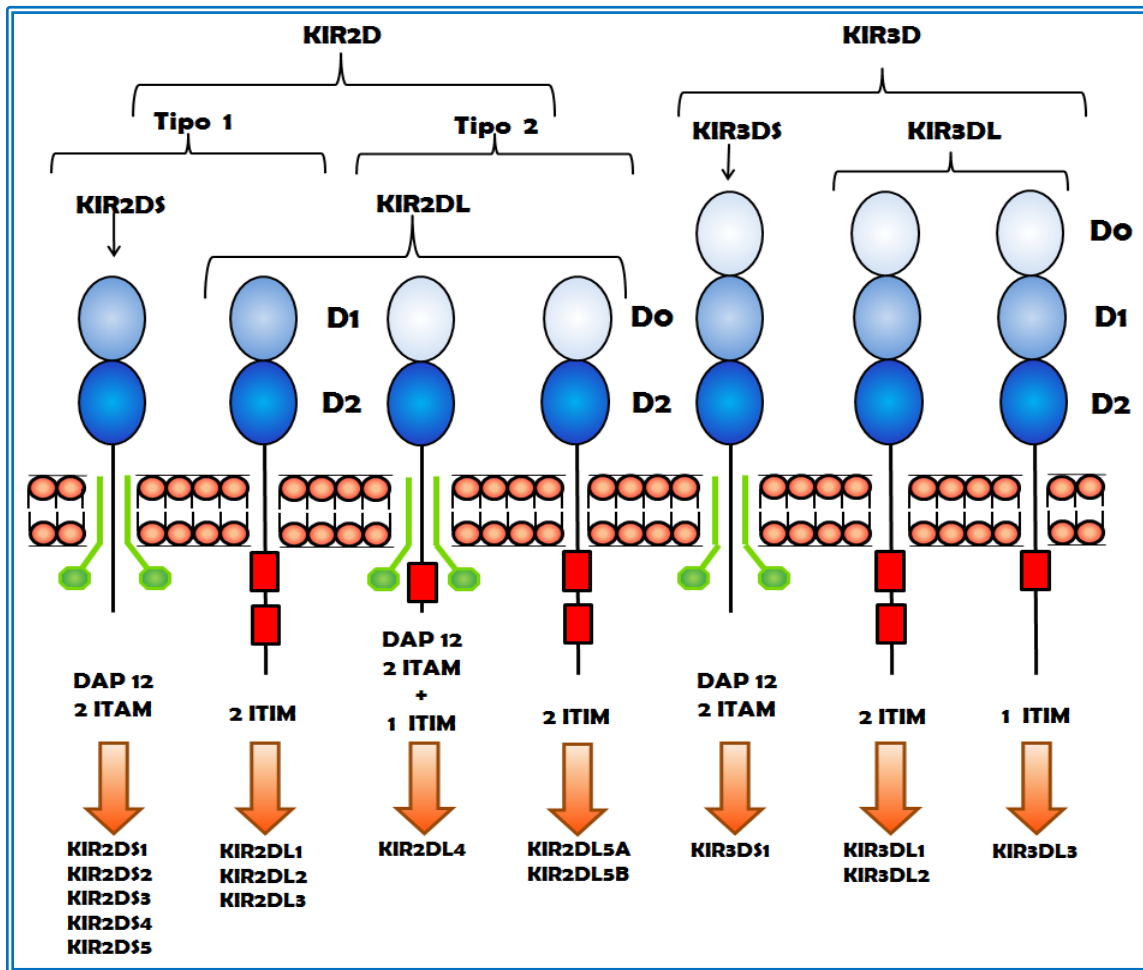


Figura 4. Estructura de receptores KIR [Modificado de <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>, 2013].

También poseen una región transmembranal y una cola citoplasmática que definen el tipo de señal para la célula NK (Bianconi, 1996). Generalmente, las colas citoplasmáticas largas (L) contienen dos motivos de inhibición basados en tirosina (*ITIM=Immune-receptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) que traducen señales inhibitorias a la célula NK; mientras las colas cortas (S) poseen un aminoácido (aa) cargado positivamente en su transmembrana que les permite asociarse con la molécula de señalización DAP12, que contiene dos motivos de activación basados en tirosina (*ITAM=Immune-receptor Tyrosine based Activation Motifs*) y regula las señales de activación después de que el receptor reconoce un ligando (Lanier, 2009). La excepción a esto es KIR2DL4, el cual sólo contiene un ITIM y posee un residuo cargado (arginina) en su región transmembranal que facilita su interacción con DAP12, lo que permite le producir señales de inhibición y activación (Maxwell, 2002).

Las proteínas KIR varían en longitud desde 306 hasta 456 aa, las diferencias en el tamaño de estas proteínas son en su mayoría consecuencia del número de dominios tipo inmunoglobulina presentes, pero otro factor que influye es la diversidad en la longitud de su cola citoplasmática (Long, 1997) (Fig. 5).

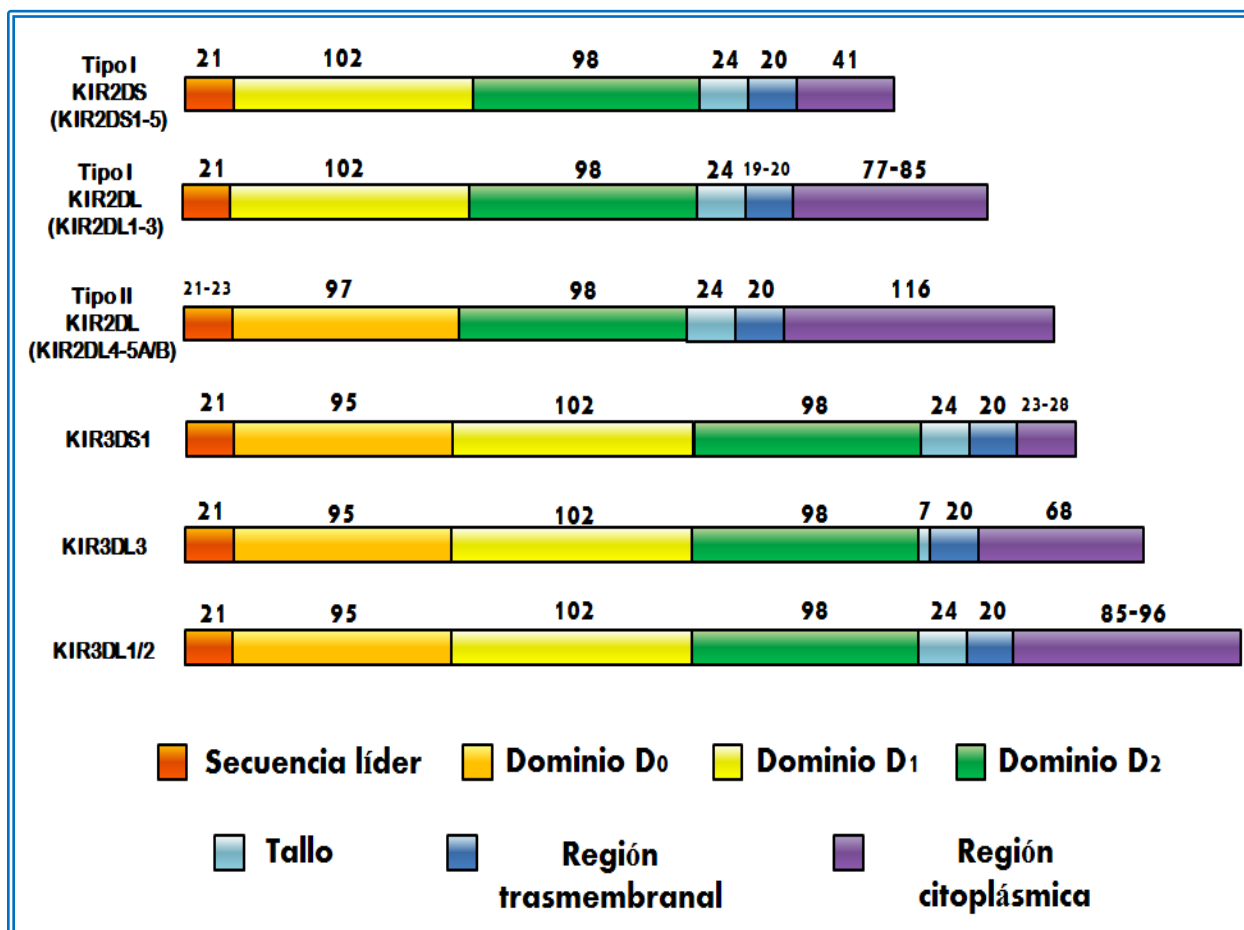


Figura 5. Características del ARNm para las proteínas KIR [Modificado de <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>, 2013].

El péptido líder de la mayoría de las proteínas KIR es de 21 aa de largo; sin embargo, la presencia de un codón de inicio diferente genera un péptido líder más largo en las proteínas KIR2DL4. La longitud del dominio D0 presente en las proteínas KIR2D de tipo II y las proteínas KIR3D es aproximadamente de 96 aa, el dominio D1 de las proteínas KIR2D de tipo I y KIR3D tiene 102 aa, mientras que el dominio D2 de todas las proteínas KIR es de 98 aa de largo. La longitud del tallo varía de 24 aa a sólo siete aminoácidos en la proteína de KIR3DL3 y la región transmembranal es de 20 aa de largo a excepción de las proteínas KIR2DL1 y KIR2DL2 que presentan un residuo más corto como resultado de una delección

de tres pares de bases en el exón 7. Finalmente, la región citoplasmática de las proteínas KIR exhibe grandes variaciones en su longitud, que van desde 23 aa en algunos alelos KIR3DS1 a 96 aa presentes en las proteínas de KIR3DL2; mientras la longitud de la cola citoplasmática puede variar de 14 aa en algunos alelos de KIR3DS1, hasta 108 aa de largo en KIR2DL4 (Selvakumar, 1997).

5.3. Función y especificidad de receptores KIR

KIR controla la respuesta de las células NK humanas, mediante señales inhibitoras o activadoras tras en el reconocimiento de ligandos HLA de clase I sobre la superficie de las células diana potenciales. Cuando los receptores KIR se unen a las moléculas HLA de clase I definen la actividad lítica de las células NK, regulando la actividad citotóxica de estas células. Los receptores KIR3DL1-3, 2DL1-3 y 2DL5 están encargados de controlar la inhibición, KIR2DS1-5 y 3DS1 dirigen la activación; mientras KIR2DL4 puede transmitir ambos tipos de señalización (Faure, 2002). Así, los dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina están involucrados con la unión al ligando y la cola citoplasmática está implicada en la señalización (Trowsdale, 2001).

Los receptores KIR reconocen motivos específicos en las moléculas HLA de clase I, las cuales son producto de genes altamente polimórficos localizados sobre el cromosoma 6 y regiones expuestas del péptido sobre ésta molécula (Marsh, 2011). KIR se une en una orientación casi ortogonal entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la molécula HLA de clase I, pero la forma en la que KIR se superpone con la molécula HLA es distinta a la del receptor de células T (Boyington, 2000). Los seis bucles del dominio D1 y D2 en la región de la bisagra del interdominio de KIR2DL y KIR3DL, forman el sitio de unión para las moléculas HLA de clase I; mientras que en KIR3D el dominio distal de la membrana D0 mejora la unión al ligando HLA de clase I (Khakoo, 2002). Por lo tanto, los motivos de unión para KIR a menudo difieren entre los individuos y su distribución es sustancialmente diferente entre poblaciones (Prugnolle, 2005).

Los receptores KIR se unen específicamente a moléculas HLA-A, -Bw4, -Cw y -G que funcionan como ligandos para estos receptores (Fig. 6).

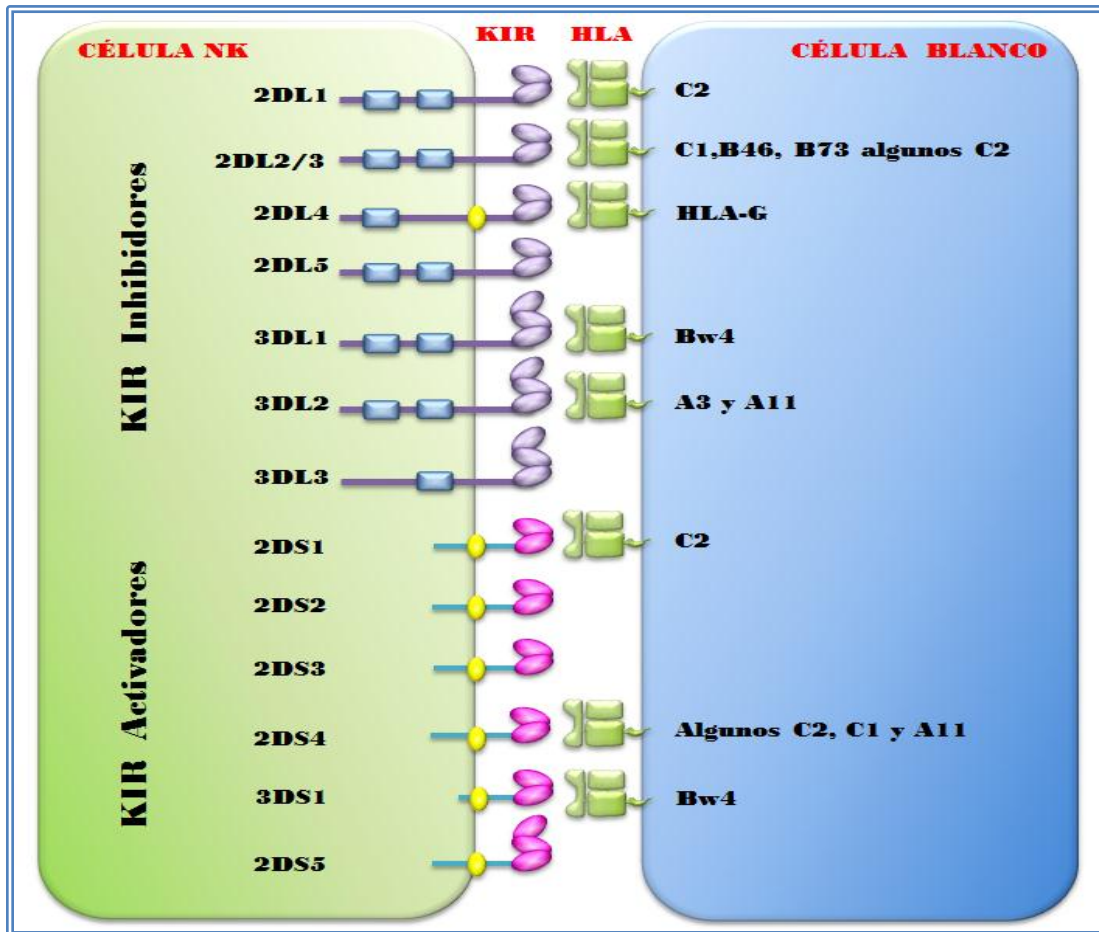


Figura 6. Ligandos de los receptores KIR [Modificado de Rajalingam, 2012, *Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice, Methods in Molecular Biology*. 882:391-414].

HLA-Cw es el locus HLA de clase I que provee el mayor número de ligandos para muchos receptores KIR, pero éstos no reconocen específicamente a cada una de las 312 variantes alélicas de HLA-Cw, la especificidad de esta interacción está definida por un dimorfismo de HLA-Cw en la posición 80 y un dimorfismo en la posición 44 de los receptores KIR (Moretta, 1995). El dimorfismo en las posiciones 77 y 80 de la secuencia de aminoácidos define dos alotipos serológicamente diferentes de HLA-Cw: grupo 1 (C1), que tiene un residuo de serina en la posición 77 (Ser77) con una asparagina en la posición 80 (Asn80) y grupo 2 (C2), que tiene un residuo de asparagina en la posición 77 (Asn77) con una lisina en la posición 80 (Lys80) (Mandelboim, 1996).

En los receptores KIR también pueden diferenciarse dos grupos: el primero tiene un residuo de lisina en la posición 44 del dominio D1 (incluye los receptores KIR2DS2, KIR2DL2 y KIR2DL3) y reconocen el alotipo C1 de HLA-Cw; mientras el segundo (contiene los receptores KIR2DS1 y KIR2DL1) presenta una metionina en dicha posición y reconoce el alotipo C2 de HLA-Cw (Moretta, 1995).

Ambos grupos de HLA-Cw reconocen receptores KIR tanto activadores como inhibidores (Colonna, 1993). Todos los alotipos HLA-Cw contienen valina (V) en la posición 76; pero casi la mitad de éstos (Cw2, Cw4, Cw5, Cw6, Cw0707, Cw15, Cw1204-05, Cw15, Cw1602, Cw17, Cw18) llevan una lisina (K) en la posición 80 (epítomos C2), uniéndose al receptor inhibidor KIR2DL1; mientras los alotipos restantes (Cw1, Cw3, Cw0701-06, Cw8, Cw1202-03/06), Cw14, Cw1601/03-04) contienen una asparagina (N) en esta posición (epítomo C1) y se unen a los receptores inhibidores KIR2DL2 y 2DL3 (Winter, 1995; Hartstein, 2011). De igual forma, dos diversos alotipos HLA-B, B46 y B73 (ambos con V76 y N80), son buenos ligandos para estos receptores inhibidores, pero además de su unión con epítomos C1, también pueden interactuar con los alotipos C2 Cw*0501 y Cw*0202 (Moesta, 2008). Las señales inhibitoras provocadas por la interacción 2DL2/3-C1 son relativamente débiles en comparación a la provocada por la interacción 2DL1-C2 (Winter, 1998).

El receptor de activación KIR2DS1 tiene dominios de tipo inmunoglobulina similares al inhibidor KIR2DL1 y también se une a HLA-C2, pero con avidéz reducida (Stewart, 2005); mientras KIR2DS2 es un receptor de activación que tiene dominios similares al inhibidor KIR2DL2, pero sin avidéz detectable para HLA-C1 (Winter, 1998).

KIR2DS4 es el receptor activador más antiguo que tiene especificidad de ligando única para subconjuntos de alotipos HLA-C acarreado epítomos C1 o C2 y HLA-A11 (Graef, 2009).

KIR3DL1/KIR3DS1 interactúan con un subconjunto de las moléculas HLA-A (HLA-A23, 24, 25 y 32) y HLA-B que llevan el epítipo Bw4 que difiere de Bw6 debido a un polimorfismo en las posiciones 77 y 80, donde los epítopos Bw4 con el aminoácido isoleucina (Ile) en la posición 80 provoca una fuerte inhibición a través KIR3DL1 (Gumperz, 1995; Thananchai, 2007). Mientras KIR3DL2 se une sólo a alotipos HLA-A3 y A11, donde la fuerza de interacción es muy sensible a la secuencia del péptido unido (Hansasuta, 2004).

El receptor KIR2DL4 se une a HLA-G de las extravellosidades trofoblásticas e induce la rápida producción de IFN- γ que promueve la vascularización de la decidua materna, la cual provee a la placenta de sangre con gases y nutrientes para el crecimiento del feto (Moffett-King, 2002; Kikuchi, 2003). Pero aún se desconocen los ligandos específicos para KIR2DS2, 2DS3, 2DS5, 2DL5 y 3DL3 (Martin, 2002).

La interacción KIR-HLA se diferencia por la intensidad de la unión y afinidad entre los receptores y sus respectivos ligandos. Los receptores se unen débilmente a los antígenos del grupo C1 y fuertemente a los del grupo C2, pero un receptor inhibidor tiene mayor afinidad que el receptor de activación (Wagtmann, 1995). Aunque la relevancia biológica de una afinidad baja no ha sido totalmente aclarada, esta podría existir para atenuar los receptores inhibitorios en situaciones donde la inhibición no es ventajosa o evitar la agresión de las células NK contra células sanas del organismo (Fan, 1997).

5.4. Diversidad de los receptores KIR

La característica del sistema de receptores KIR que lo distingue de otros tipos de receptores de la célula NK es su diversidad, aportada por diversos factores tales como: contenido específico de genes KIR en cada individuo, polimorfismos en la secuencia de nucleótidos y su expresión estocástica (**Fig. 7**). Esta diversidad en los receptores KIR contribuye a diferencias en la reactividad de las células NK (Rajalingam, 2012).

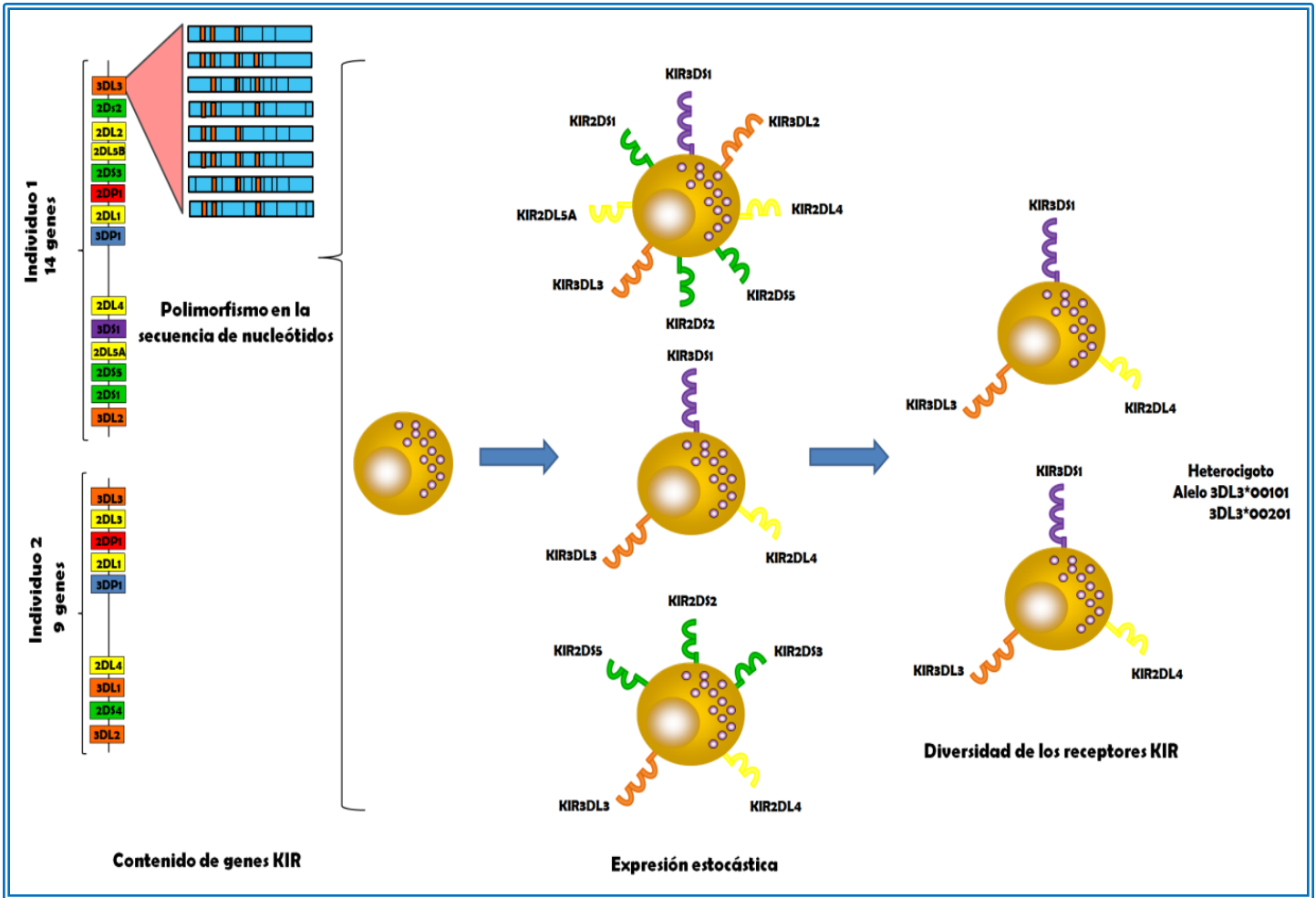


Figura 7. Diversidad de los receptores KIR [Cortesía de Bravo-Flores E. 2013]

5.4.1. Contenido de genes KIR

Se sabe que existen 17 *loci* de genes KIR y que combinaciones específicas de estos genes se agrupan en un haplotipo dentro de 100-200 Kb del LRC. Estas combinaciones han originado diversos haplotipos clasificados con base en su contenido de genes KIR en dos grupos: los haplotipos del grupo A con función inhibidora y los haplotipos activadores del grupo B, que varían en el número y tipo de genes que los conforman (Uhrberg; 2002). Estos grupos se distinguieron originalmente usando la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), donde la presencia de un fragmento de aproximadamente 24 Kb obtenido por HindIII indica la presencia de un haplotipo del grupo B (Uhrberg, 1997).

La organización de los haplotipos KIR sobre el cromosoma 19q13.4 (**Fig. 8**), se estructura en relación con la posición de cuatro genes marco (*KIR3DL3*, *2DL4*, *3DL2* y *3DP1*) o estructurales, que se encuentran presentes salvo muy pocas excepciones en casi todos los haplotipos (cuyo orden se determinó a partir de la secuenciación de haplotipos KIR prototipo) y una región de 14 Kb con repeticiones L1 río arriba de *2DL4* que divide el haplotipo en dos segmentos, uno colindante con el centrómero y otro cercano al telómero (Wilson, 2000). Los genes dentro de cada fragmento presentan un alto desequilibrio de ligamiento, el cual es menor entre los genes presentes dentro de cada segmento que conforma un haplotipo (Shilling, 2002; Middleton, 2007).

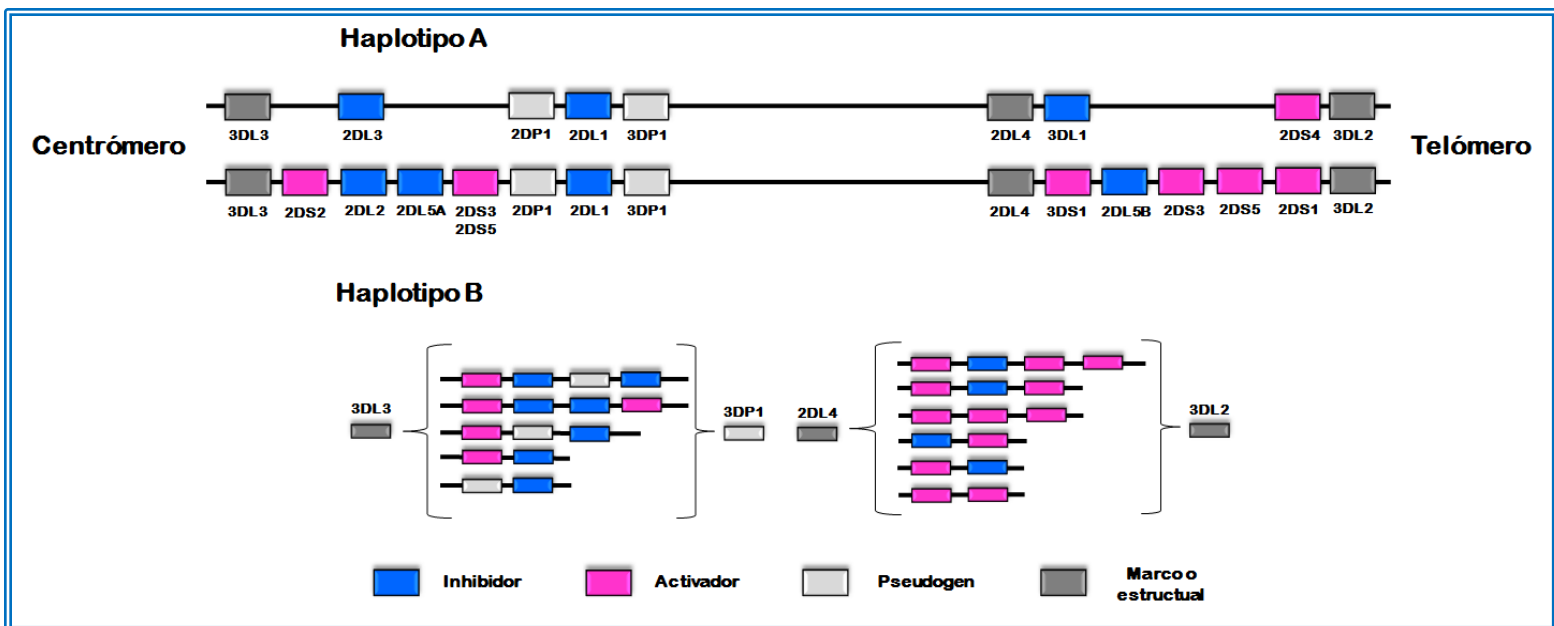


Figura 8. Variabilidad de los haplotipos KIR [Modificado de Kulkarni, 2008, *Seminars in Immunology*. 20:343-352].

El conjunto de genes *KIR* está flanqueado por los genes *KIR3DL3* en el extremo centromérico y *KIR3DL2* en el extremo telomérico; mientras los genes *KIR3DP1* y *2DL4* están ubicados centralmente y entre ellos se encuentra un punto de recombinación (Martin, 2004). Estos cuatro genes delimitan dos regiones del haplotipo KIR, variables en el contenido genético; así la región del centrómero contiene los genes *KIR2DL3*, *2DP1*, *2DL1*, *2DS2*, *2DL2*, *2DL5A*, *2DS3* y *2DS5*; mientras que la región del telómero contiene a *KIR3DL1*, *2DS4*, *3DS1*, *2DL5A*, *2DS3*, *2DS5* y *2DS1* (Pérez, 2010).

Así, el haplotipo A está compuesto por 7 genes, sólo un gen activador *KIR2DS4*, tres genes inhibidores *KIR2DL3*, *KIR2DL1*, *KIR3DL1* y el pseudogen *KIR2DP1*. Este haplotipo no varía en el contenido de genes, pero muestra una extensa variabilidad a nivel alélico (**Fig. 8, Haplotipo A**). En contraste, el haplotipo B exhibe diversidad tanto en número y contenido de genes como en variabilidad alélica. Dicho haplotipo contiene uno o más genes activadores (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* y *KIR3DS1*) y pueden incorporar los genes inhibidores ausentes en el haplotipo A (*KIR2DL2* y *KIR2DL5*), existiendo hasta la fecha más de 50 haplotipos B diferentes (**Fig. 8, Haplotipos B**), caracterizados por secuenciación y análisis de segregación de haplotipos en familias (Hsu, 2002).

Múltiples eventos de recombinación recíproca en el centro del complejo KIR entre 3DP1 y 2DL4, presumiblemente diversifica el contenido genético de los haplotipos KIR entre individuos y poblaciones (Yawata, 2002; Norman, 2009). Cada haplotipo KIR se genera por la combinación de un motivo centromérico y un motivo telomérico, por lo que la mayoría de los haplotipos publicados hasta la fecha se pueden explicar por la recombinación de 21 motivos genéticos en la porción del centrómero y 21 en la porción del telómero (**Fig. 9**).

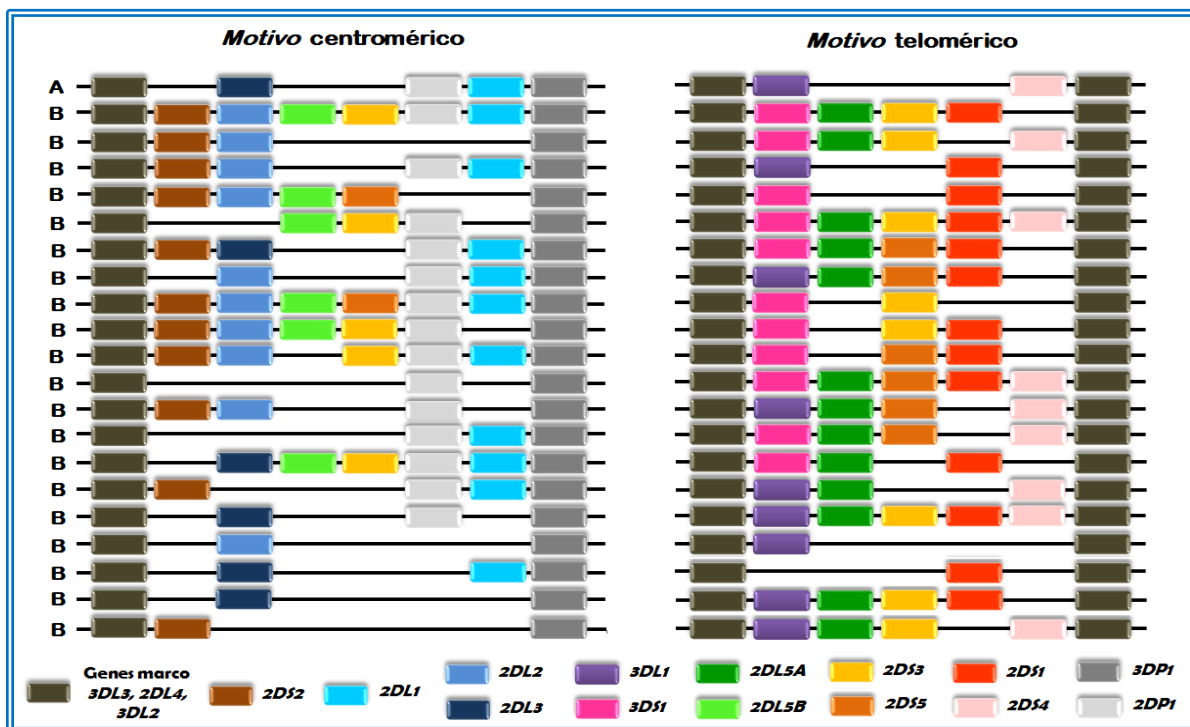


Figura 9. Motivos contenidos en la porción centromérica y telomérica que recombinan para obtener los haplotipos más comunes. [Modificado de Rajalingam, 2012, Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice, Methods in Molecular Biology. 882:391-414].

Los eventos de recombinación también se presentan fuera de la región entre 3DP1 y 2DL4, tratándose de entrecruzamiento no alélico generando varios haplotipos poco comunes, incluyendo haplotipos truncos que han perdido genes estructurales (Hsu, 2002; Shilling, 2002) O haplotipos elongados que contienen genes duplicados (Williams, 2003; Martin, 2003). La herencia de los haplotipos paternos y maternos que comprenden diferente contenido genes de KIR (A+A, A+B o B+B) genera una extraordinaria diversidad en los seres humanos.

5.4.2. Polimorfismo en la secuencia de nucleótidos de genes *KIR*

Los genes KIR son altamente polimórficos y ocupan una de las regiones de más rápida evolución del genoma humano. Además de la diversidad en el contenido genético, cada gen KIR exhibe un polimorfismo en su secuencia de nucleótidos (Rajalingam, 2001; Shilling, 2002; García, 2003). A la fecha 614 secuencias de nucleótidos que codifican para 321 proteínas KIR diferentes están depositadas en *IPD-KIR database*, donde se observa que los receptores KIR inhibidores son más polimórficos que los receptores activadores, encontrando que el polimorfismo alélico más alto está en los *loci* 3DL1, 3DL2 y 3DL3 (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>).

El polimorfismo en su secuencia tiene consecuencias funcionales que influyen en su expresión, unión a su ligando y actividad citotoxicidad o secreción de citocinas (Gardiner, 2001; Carr, 2005; Yawata, 2006;). Además algunas secuencias de KIR son alelos nulos que llevan un codón de paro prematuro o sustitución / deleción / inserción de nucleótidos que alteran el marco de lectura de la síntesis de proteínas, lo que afecta a su expresión en la superficie celular (Maxwell, 2002).

5.4.3. Diversidad en el repertorio de receptores KIR sobre clonas de células NK

Además de la variación en el contenido de genes y polimorfismo en la secuencia, se han descrito diferencias en el repertorio de receptores KIR sobre cada célula NK (Valiante, 1997) y en el nivel de expresión del ARNm de genes y alelos *KIR* (Trompeter, 2005).

Los receptores KIR se expresan de forma estocástica sobre las células NK maduras, de tal manera que cada clon de células NK en un individuo no expresa todo el conjunto de genes *KIR* presentes en su genoma; sino sólo una porción de estos en una aparente combinación aleatoria. Esta diversidad en la expresión de genes KIR produce una amplia gama de clones de células NK funcionalmente distintas, que son necesarias para una detección rápida de las células blanco que han perdido la expresión de moléculas HLA de clase I (Raulet, 2001).

Un clon de células NK puede expresar en promedio tres o cuatro diferentes receptores KIR sobre su superficie, pero la mayoría de los individuos tienen seis a nueve receptores expresados sobre la membrana de una célula NK y mantiene estable su repertorio de receptores KIR adquirido a lo largo de divisiones celulares posteriores (Uhrberg, 2002).

No obstante se ha detectado el ARNm de todos los genes *KIR* (a excepción de *KIR2DP1* y *3DP1*), debido a la falta de anticuerpos específicos no se ha confirmado la expresión en la superficie celular de ciertas proteínas; pues el ARNm sufren corte y empalme alternativo que produce isoformas capaces de obstaculizar la expresión del receptor (Dohring, 1996).

Aunque el repertorio de KIR se determina en gran medida por factores genéticos (Shilling, 2002b), se encontró que la presencia del ligando HLA de clase I afín aumenta la frecuencia de las células NK que expresan el receptor específico (Yawata, 2006). Por otra lado, existen pruebas de que diversos mecanismos epigenéticos modulan los patrones de expresión de los receptores KIR (Santourlidis, 2002; Chan, 2003; Trompeter, 2005) y de la influencia epistática que tienen ciertos genes *KIR* sobre la expresión de un receptor KIR específico (Schonberg, 2011).

A diferencia de las células T y B, las células NK usan una estrategia para reconocer múltiples receptores mediante la cual una célula NK individual puede ser activada a través de diversos receptores de forma independiente o en combinación, dependiendo de los ligandos presentados por la célula blanco en un encuentro dado (Raulet, 2001) y si una célula NK utiliza tanto receptores inhibidores y activadores para reconocer el objetivo, el equilibrio entre estas señales dispares determina la acción de esta célula NK (Lanier, 2005).

5.5. Función de KIR en el TCPH

Se ha encontrado que las células NK son la primera población de linfocitos que aparece en SP rápidamente después un TCPH y que el repertorio de receptores KIR sobre las células NK reconstituidas a partir de precursores hematopoyéticos son consistentemente del donador (Cooley, 2007).

Las células NK derivadas del donador pueden ser alorreactivas cuando sus KIR inhibidores no encuentran en el receptor un ligando HLA de clase I importante presente en el donador. Cuando el ligando del receptor inhibidor está ausente o alterado, la célula NK no puede unirse a su correspondiente molécula HLA activándose y destruyendo a la célula en cuestión. Este mecanismo de alorreactividad presenta ventajas y desventajas en el TCPH de donador HLA idéntico, ya que diferencias entre las células NK del donador y la expresión de las moléculas HLA clase I del receptor predispone la existencia de una subclase de células NK reactivas que favorecen el implante del injerto por la liberación de citoquinas hematopoyéticas, una mayor reconstitución inmune y el efecto de injerto contra leucemia; disminuyendo las complicaciones infecciosas por su actividad antiviral, la posibilidad de recaída hematológica e incidencia de rechazo del injerto por lisar las células T del hospedero, pero incrementan la EICH (Ruggeri, 2002).

Además de la falta de ligandos HLA de clase I en el receptor para las células NK del donador, la expresión de receptores KIR activadores sobre las células NK del donador también muestra influencia en el resultado del TCPH; ya que donadores con genotipo AA (que expresan uno o ningún KIR activador) en comparación con donadores de genotipo Bx (que expresan de uno a seis KIR activadores), mostraron una mayor protección a la recaída y una mejor sobrevida libre de enfermedad (Cooley, 2010).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, los TCPH se realizan con células provenientes de un donador relacionado al cual se le realizan estudios de gabinete clínico, grupo sanguíneo, carga viral e histocompatibilidad. De estos estudios, el HLA se realiza a nivel molecular de mediana resolución, para comprobar la compatibilidad en los *loci* A, B, C, DR y DQ entre donador y receptor. Sin embargo, el 80% de los pacientes que reciben un TCPH de un donador relacionado HLA idéntico, desarrollan eventos inflamatorios conocidos como EICH a causa de otras diferencias genéticas. Por lo anterior, es necesario estudiar otros genes que podrían estar involucrados con el padecimiento de la EICH, como son los genes *KIR*.

III. JUSTIFICACIÓN

Si se demuestra que los genes *KIR* están involucrados con el padecimiento de la EICH, esto permitirá diseñar estrategias que reduzcan la gravedad de este padecimiento, mediante la administración oportuna de un tratamiento de inmunosupresión optimizado que ayude a controlar las complicaciones más habituales de la EICH para incrementar la posibilidad de éxito del trasplante y mejorar la sobrevida de los pacientes.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre los alelos de los genes *KIR2DS4* y *KIR3DP1* con el padecimiento de la Enfermedad de Injerto contra Hospedero?

V. HIPÓTESIS

Los alelos de los genes *KIR2DS4* y *KIR3DP1* se asociarán como factores de riesgo para el padecimiento de la Enfermedad de Injerto contra Hospedero.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar si los alelos de los genes *KIR2DS4* y *KIR3DP1* se asocian como factores de riesgo para el padecimiento de la Enfermedad Injerto contra Hospedero.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Tipificar los genes *KIR* en el binomio (donador-receptor) durante la etapa previa al trasplante.
2. Tipificar los genes *KIR* en el receptor con EICH.
3. Identificar los genotipos *KIR* en el binomio (donador-receptor) durante la etapa previa al trasplante.
4. Identificar los genotipos *KIR* en el receptor con EICH.
5. Determinar los alelos de *KIR2DS4* y *KIR3DP1* en el binomio (donador-receptor) durante la etapa previa al trasplante.
6. Determinar los alelos de *KIR2DS4* y *KIR3DP1* en el receptor con EICH.

VIII. METODOLOGÍA

8.1. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra necesaria para nuestro estudio (n=54 binomios donador-receptor) se calculó con el programa estadístico *EPIDAT 3.1* tomando en cuenta los siguientes parámetros: OR de 3.0, IC del 95%, poder estadístico del 80% y con base en la frecuencia génica de KIR, empleando la proporción de 36.4% correspondiente a KIR2DS5, descrito como el gen menos frecuente en donadores de CPH dentro de un estudio previo realizado en población Caucásica sobre pacientes con leucemia que recibieron un TCPH HLA idéntico (Savani, 2007); ya que no existen datos reportados con anterioridad en población mestizo mexicana con trasplante.

8.2. Características de los binomios donador-receptor para el estudio

8.2.1 Criterios de inclusión

Ser mexicano con ascendencia de dos generaciones mexicanas o más.

Ser diagnosticado con enfermedad hemato-oncológica de alto riesgo.

Tener 18 años de edad o más al momento del diagnóstico sin importar el género.

Recibir un trasplante alogénico de CPH obtenidas de SP, provenientes de un donador relacionado HLA idéntico, sin importar su género y edad.

Recibir el mismo régimen de acondicionamiento mieloablativo previo al trasplante.

Recibir el mismo tratamiento profiláctico para la EICH posterior al trasplante.

Presentar EICHa, crónico o ambos posterior al TCPH.

8.2.2 Criterios de exclusión

Ser extranjero o mexicano sin ascendencia de dos generaciones mexicanas o más.

No entrar al protocolo de trasplante aun siendo diagnosticado con una enfermedad hemato-oncológica de alto riesgo.

Tener menos de 18 años de edad al momento del diagnóstico sin importar el género.
Recibir un trasplante alogénico de CPH obtenidas de SP, provenientes de un donador no relacionado.
No recibir un régimen de acondicionamiento mieloablativo previo al trasplante.
No recibir el mismo tratamiento profiláctico para la EICH posterior al trasplante.
No desarrollar EICHa o crónica posterior al TCPH.
Pacientes que presenten alguna complicación no relacionada a la EICH.
Diagnóstico de alguna enfermedad autoinmune, diabetes u otro tipo de cáncer.

8.2.3 Criterios de eliminación

Muestra insuficiente del binomio donador-receptor pretrasplante y del receptor postrasplante.
ADN degradado del donador o receptor.
No tener muestra de ADN pretrasplante del binomio donador-receptor y del receptor postrasplante.
No tener ADN suficiente pretrasplante del binomio donador-receptor y del receptor postrasplante.
No tener resultados de histocompatibilidad del binomio donador-receptor.
No tener resultados completos de la tipificación de genes y/o alelos KIR del binomio donador-receptor pretrasplante y del receptor postrasplante.

8.3. Obtención de las muestras de ADN

Se tomó una muestra de SP de cada binomio donador-receptor durante la etapa previa al trasplante y del receptor una vez transcurridos 100 días postrasplante. La extracción de ADN de cada una de las muestras se realizó mediante la técnica de perclorato. La concentración y calidad de los ácidos nucleicos obtenidos se evaluó mediante espectrofotométrica, mientras su integridad se verificó en un gel de agarosa al 0.8%. Las muestras se llevaron a una concentración de 75 ng/ul y se almacenaron a -70°C.

8.4. Determinación de genes y alelos de *KIR* por PCR-SSP

Las muestras de ADN obtenidas de cada binomio donador-receptor durante la etapa previa al trasplante y del receptor postrasplante se utilizaron para el estudio molecular de 15 genes y dos pseudogenes de *KIR*; así como de los alelos de *KIR2DS4* y *KIR3DP1* (**Fig. 10**) mediante la técnica de mediana resolución denominada PCR-SSP (*kit* comercial, *Invitrogen*).

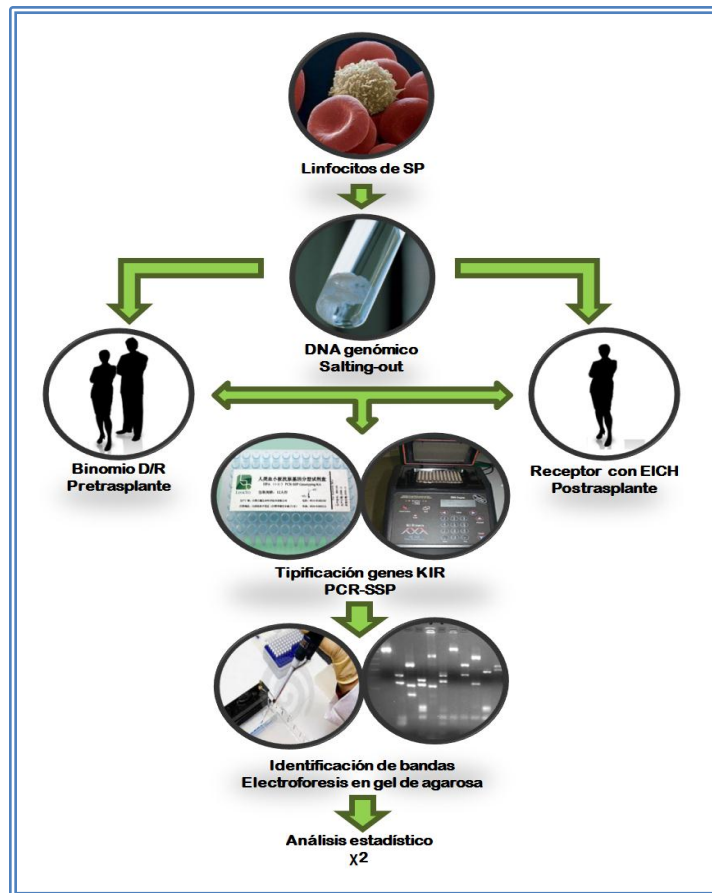


Figura 10. Estrategia para la Tipificación de genes y alelos *KIR* usando la técnica de PCR-SSP [Cortesía de Bravo-Flores E. 2013].

8.5. Análisis estadístico

Se analizaron las frecuencias génicas, genotípicas, haplotípicas y alélicas de *KIR* con la prueba de χ^2 o prueba exacta de Fisher, además de realizarse un análisis multivariado. Cuando el valor fue de $p < 0.05$ el resultado se consideró estadísticamente significativo. El vigor de asociación se determinó calculando el OR con IC 95%.

IX. RESULTADOS

9.1. Características de la población de estudio

Se reclutaron 39 pacientes con enfermedad hemato-oncológica que recibieron un TCPH alogénico de SPM proveniente de un donador relacionado entre octubre del 2003 y mayo del 2012. Todos los trasplantes se realizaron en el Hospital de Especialidades CMN-SXXI, después de recibir un acondicionamiento mieloablativo de alta intensidad vía intravenosa

Cuadro 2.

Cuadro 2. Detalles del procedimiento para el trasplante	
n=39	(100%)
Tipo de donador	Hermano
Fuente de las CPH	SP
Acondicionamiento mieloablativo	BuCy + VP16

BuCy: Basado en busulfan con ciclofosfamida, **VP16:** Con etopósido

Únicamente 37 binomios donador-receptor se incluyeron en este análisis por tener un donador HLA idéntico. Las características de pacientes y donadores se enlistan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Características de la población de estudio					
No. de binomios	n=37	n	(%)	n	(%)
Edad del Paciente (años)				Edad del Donador (años)	
	18-28	9	(24.4)	18-28	12 (32.4)
	29-38	14	(37.8)	29-38	13 (35.1)
	39-48	12	(32.4)	39-48	9 (24.4)
	49-58	2	(5.4)	49-58	3 (8.1)
Media de la edad del paciente	35.0			Media de la edad del donador	33.8
Género Paciente/Donador				Diagnóstico	
	M/M	12	(32.5)	LMA	18 (48.6)
	M/F	9	(24.3)	LMC	2 (5.4)
	F/M	9	(24.3)	LLA	9 (24.4)
	F/F	7	(18.9)	LLC	2 (5.4)
Categoría del riesgo de la enfermedad	Alto riesgo	37	(100.0)	SMD	3 (8.1)
Compatibilidad HLA	10/10	37	(100.0)	AAG	3 (8.1)

M: Masculino, **F:** Femenino, **LLA:** Leucemia linfóide aguda, **LLC:** Leucemia linfóide crónica, **LMA:** Leucemia mieloide aguda, **LMC:** Leucemia mieloide crónica, **SMD:** Síndrome mielodisplásico, **AAG:** Anemia aplásica grave

Los resultados de histocompatibilidad (tipificación de *loci* HLA-A, -B, -Cw, -DR y -DQ mediante la técnica de PCR-SSP) se obtuvieron del Banco de Sangre del Hospital de Especialidades del CMN-SXXI.

9.2. Tipificación de genes *KIR*

Se estudiaron 37 binomios donador-receptor mestizos Mexicanos (37 receptores con enfermedad hemato-oncológica y 37 donadores sanos). Estos 37 pacientes junto con su donador de CPH, fueron tipificados mediante la técnica de PCR-SSP utilizando un *kit* (*Invitrogen*) que determina la presencia o ausencia de genes *KIR*. Los productos de PCR sobre un gel de agarosa al 1% de tres muestras representativas (a, b y c) se pueden observar en la **Figura 11**; donde cada carril representa la amplificación de un gen con su respectivo control interno de 800pb o 200pb y un control negativo, los cuales indican que la reacción se realizó correctamente, además de un marcador de peso molecular que establece el tamaño relativo de cada fragmento. Pozos que presentan una banda con el peso determinado fueron positivas mientras se tomaron como negativas aquellas donde únicamente el control interno está presente.

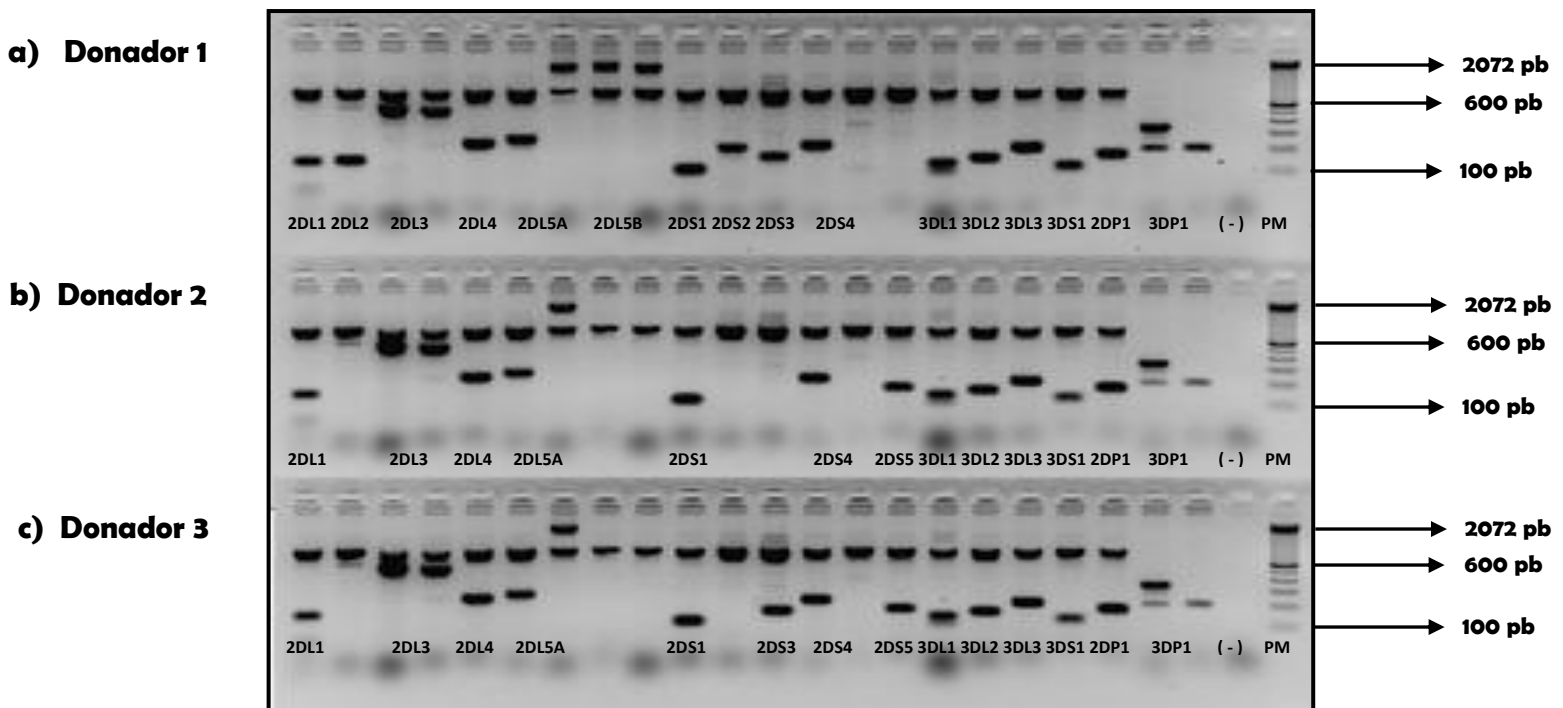


Figura 11. Genotipificación de *KIR*. a, b y c muestran imágenes de productos de PCR sobre geles de agarosa al 2% de tres pacientes con leucemia; derivados de la amplificación de genes *KIR* mediante la técnica de PCR-SSP. Se observa un fragmento de aproximadamente 800pb como control interno, excepto en el penúltimo y antepenúltimo carril que tienen un control interno de 200pb; mediante bandas de diferentes tamaños (de 100 a 1893pb) se muestran los genes *KIR* presentes en cada individuo y la ausencia de estos a través de la falta de una banda sobre un carril determinado.

9.3. Frecuencias génicas de KIR

Los porcentajes de las frecuencias génicas para cada *locus* KIR, se determinaron por conteo directo y se encuentran descritos en las siguientes tablas de acuerdo a su actividad en: KIR inhibidores, activadores y pseudogenes. Los genes *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* y el pseudogen *KIR3DP1* se presentaron de forma constitutiva en el 100% de los individuos.

9.3.1. Pacientes con leucemia y donadores

Los resultados de 32 pacientes con leucemia y sus donadores se compararon con las frecuencias génicas de KIR descritas en un estudio previo (Hernández, 2008) en población mexicana sana (**Tabla 1**).

Dentro del grupo de pacientes con leucemia y sus donadores, los genes *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* y el pseudogen *KIR2DP1* mostraron una frecuencia similar a la previamente descrita en el grupo control. Las frecuencias génicas de *KIR2DL5A*, *2DS1*, *2DS5* y *3DS1* incrementaron en pacientes y donadores comparadas con el grupo control, presentando una variación significativa ($p < 0.05$). Dos genes inhibidores *KIR2DL2*, *KIR2DL5B* y dos activadores *KIR2DS2*, *KIR2DS3* presentaron frecuencias más elevadas dentro del grupo de donadores, pero únicamente en el gen activador *KIR2DS3* y en el gen inhibidor *KIR2DL5B* se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) tras comparar a los donadores con grupo control.

9.3.2. Pacientes con TCPH

El porcentaje de las frecuencias para los 15 genes y 2 pseudogenes *KIR* determinados en 37 pacientes sometidos a un TCPH y sus donadores, se enumeran en la **Tabla 2**, donde se observa que las frecuencias génicas de KIR durante el pretrasplante se ven modificadas por la carga genética del donador tras el TCPH.

Tabla 1. Frecuencias génicas de KIR en pacientes Mexicanos con leucemia.

KIR		Genes															Pseudogenes	
		Receptor Inhibidor							Receptor Activador									
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1
Pre- TCPH n=32	%	96.9	43.8	96.9	100.0	56.3 ^a	12.5	96.9	100.0	100.0	56.3 ^b	43.8	18.8	96.9	50.0 ^c	56.3 ^d	96.9	100.0
Donadores n=32	%	93.8	56.3	93.8	100.0	56.3 ^e	28.1 ⁱ	87.5	100.0	100.0	56.3 ^f	56.3	31.3 ^j	87.5	53.1 ^g	56.3 ^h	93.8	100.0
*Controles n=120	%	97.5	38.5	94.2	100.0	36.0	11.4	93.4	100.0	100.0	38.5	38.5	13.1	92.6	33.6	38.5	100.0	100.0

*: Frecuencias de genes *KIR* en población mexicana reportados por Hernández. E. (2008).

#: Porcentaje de las frecuencias de genes *KIR*; **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor; **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Pre-TCPH vs. Controles: ^a(p=0.005, OR=2.3, 1.3-4.0), ^b(p=0.02, OR=1.9, 1.1-3.5), ^c(p=0.02, OR=1.9, 1.1-3.4), ^d(p=0.02, OR=1.9, 1.1-3.5) IC95%.

Donadores vs. Controles: ^e(p=0.005, OR=2.3, 1.3-4.0), ^f(p=0.02, OR=1.9, 1.1-3.5), ^g(p=0.007, OR=2.2, 1.2-3.9), ^h(p=0.02, OR=1.9, 1.1-3.5) IC95%.

Pre-TCPH vs. Donadores: ⁱ(p=0.009, OR=0.4, 0.2-0.8) ^j(p=0.04, OR=0.5, 0.3-0.9) IC95%

Tabla 2. Frecuencias génicas de KIR en pacientes Mexicanos con TCPH.

KIR		Genes															Pseudogenes	
		Receptor Inhibidor							Receptor Activador									
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1
Pre- TCPH n=37	%	97.3	40.5	97.4	100.0	56.8	16.2	97.3	100.0	100.0	56.8	40.5	21.6	97.3	46.2	51.4	97.3	100.0
Pos-TCPH n=37	%	94.6	48.6	94.6	100.0	59.5	24.3	91.9	100.0	100.0	59.5	48.6	40.5	91.9	45.9	59.5	94.6	100.0
Donadores n=37	%	94.6	48.6	94.6	100.0	56.8	27.0	86.5	100.0	100.0	5.8	48.6	37.8	86.5	48.6	56.8	94.9	100.0

#: Porcentaje de las frecuencias de genes *KIR*; **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor; **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

9.3.3. Pacientes sin EICH.

Las frecuencias génicas de *KIR* en los 9 pacientes que no desarrollaron EICH tras recibir un TCPH HLA idéntico de un donador relacionado se describen en la **Tabla 3**, donde no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) tras comparar la etapa del postrasplante con la del pretrasplante.

9.3.4. Pacientes con EICH

De los 37 pacientes que recibieron un TCPH de donador relacionado HLA idéntico, 28 pacientes (75.7%) desarrollaron EICH posterior al trasplante, cuyas características se muestran en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Características de la EICH			
Grado de EICH	n=37	n	(%)
	EICHa+EICHc	8	(21.6)
	EICHc	20	(54.1)
	s/EICH	9	(24.3)
Inicio de EICH (días)			
	101-200	15	(53.6)
	201-300	13	(46.4)
Media de inicio de EICH	211.8		
Profilaxis de EICH	CSA+MTX+Prednisona	37	(100.0)

CSA: Ciclosporina A, MTX: Metotrexate.

La distribución de las frecuencias de genes *KIR* observadas en pacientes que desarrollaron EICH tras recibir un TCPH de un donador relacionado se encuentra representada en la **Tabla 4**.

En este grupo se observaron diferencias entre la etapa del postrasplante y pretrasplante, específicamente para los *loci* 2DL5B y 2DS3 cuya frecuencia incrementó después del trasplante; pero únicamente se observó una variación significativa ($p<0.05$) en la frecuencia del gen *KIR2DS3*.

Tabla 3. Frecuencias génicas de KIR en pacientes sin EICH.

KIR	Genes																	
	Receptor Inhibidor									Receptor Activador						Pseudogenes		
	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1	
Pre- TCPH n=9	%	100.0	33.3	100.0	100.0	66.7	22.2	100.0	100.0	100.0	66.7	33.3	33.3	100.0	55.6	66.7	100.0	100.0
Pos- TCPH n=9	%	100.0	55.6	100.0	100.0	77.8	33.3	100.0	100.0	100.0	77.8	55.6	44.4	100.0	66.7	77.8	100.0	100.0
Donador n=9	%	100.0	55.6	100.0	100.0	66.7	33.3	88.9	100.0	100.0	66.7	55.6	33.3	88.9	66.7	66.7	100.0	100.0

%; Porcentaje de las frecuencias de genes *KIR*; **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor; **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Tabla 4. Frecuencias génicas de KIR en pacientes que desarrollaron EICH.

KIR	Genes																	
	Receptor Inhibidor									Receptor Activador						Pseudogenes		
	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1	
Pre- TCPH n=28	%	96.4	42.9	96.4	100.0	53.6	14.3	96.4	100.0	100.0	53.6	42.9	17.9	96.4	50.0	53.6	96.4	100.0
Post- TCPH n=28	%	92.9	46.4	92.9	100.0	53.6	21.4	89.3	100.0	100.0	53.6	46.4	39.3^a	89.3	39.3	53.6	92.9	100.0
Donador n=28	%	92.9	46.4	92.9	100.0	53.6	25.0	85.7	100.0	100.0	53.6	46.4	39.3	85.7	42.9	53.6	92.9	100.0

%; Porcentaje de las frecuencias de genes *KIR*; **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor; **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Post-TCPH vs. Pre-TCPH: ^a(p=0.006, OR=3.1, 1.6-5.8) IC95%.

9.3.5. Pacientes con EICH aguda y crónica.

La **Tabla 5** muestra los porcentajes de las frecuencias génicas de KIR en los pacientes que después de un TCPH desarrollaron EICH a anterior a una EICHc, sin encontrar una variación significativa ($p>0.05$) después de comparar las frecuencias obtenidas después del trasplante con las de la etapa previa.

De igual forma, en la **Tabla 6** están representados los porcentajes de las frecuencias en pacientes que desarrollaron únicamente EICHc posterior al TCPH.

Después de comparar las frecuencias génicas en cada una de las etapas del trasplante, se observaron diferencias específicamente para los *loci* 2DL5B y 2DS3 cuya frecuencia incrementó una vez recibido el TCPH; donde solo se observó una variación significativa ($p<0.05$) en la frecuencia del gen *KIR2DS3*.

Tabla 5. Frecuencias génicas de KIR en pacientes que desarrollaron EICH aguda.

KIR		Genes																
		Receptor Inhibidor									Receptor Activador						Pseudogenes	
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1
Pre- TCPH n=8	%	100.0	12.5	100.0	100.0	62.5	0.0	100.0	100.0	100.0	62.5	12.5	0.0	100.0	62.5	62.5	100.0	100.0
Post- TCPH n=8	%	100.0	12.5	100.0	100.0	62.5	12.5	75.0	100.0	100.0	62.5	12.5	25.0	75.0	50.0	62.5	100.0	100.0
Donador n=8	%	100.0	12.5	100.0	100.0	62.5	12.5	62.5	100.0	100.0	62.5	12.5	15.0	62.5	62.5	62.5	100.0	100.0

%; Porcentaje de las frecuencias de genes *KIR*; **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor; **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Tabla 6. Frecuencias génicas de KIR en pacientes que desarrollaron EICH crónico.

KIR		Genes																
		Receptor Inhibidor									Receptor Activador						Pseudogenes	
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	2DP1	3DP1
Pre- TCPH n=20	%	95.0	55.0	95.0	100.0	50.0	20.0	95.0	100.0	100.0	50.0	55.0	25.0	95.0	45.0	50.0	95.0	100.0
Post- TCPH n=20	%	90.0	60.0	90.0	100.0	50.0	25.0	95.0	100.0	100.0	50.0	60.0	45.0 ^a	95.0	35.0	50.0	90.0	100.0
Donador n=20	%	90.0	60.0	90.0	100.0	50.0	30.0	95.0	100.0	100.0	50.0	6.0	50.0	95.0	35.0	50.0	90.0	100.0

%; Porcentaje de las frecuencias de genes *KIR*; **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor; **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Post-TCPH vs. Pre-TCPH : ^a(p=0.003, OR=2.5, 1.4-4.8) IC95%.

9.4. Frecuencias genotípicas de KIR

La identificación de los genes *KIR* presentes en cada una de las muestras; sin tomar en cuenta los subtipos alélicos de KIR2DL5 (2DL5A y 2DL5B), permitió determinar el genotipo KIR de cada muestra, tras su comparación con genotipos de referencia previamente reportados en <http://www.allelefreqencies.net>, donde actualmente se describen 489 genotipos KIR diferentes que se han encontrado en 16,196 individuos de 137 poblaciones del mundo.

Dentro de cada genotipo los genes *KIR* están clasificados en dos grupos, definidos por la presencia de miembros mutuamente excluyentes de la familia KIR2DL; donde el grupo con KIR2DL1 y KIR2DL3 se denominó A y aquel que incluía KIR2DL2 fue designado como B; mientras los genes marco o estructurales se agruparon con los pseudogenes. Los porcentajes de las frecuencias para los diferentes genotipos KIR se encuentran descritos dentro de cada una de las siguientes tablas, donde ningún genotipo no descrito en esta referencia, se observó dentro de nuestra población de estudio.

9.4.1. Pacientes con leucemia y donadores

Los genotipos identificados en pacientes con leucemia, sus donadores y en el grupo control, los genes que conforman cada genotipo; así como las frecuencias de cada uno de ellos se muestran en la **Tabla 7**.

Se identificaron 9 genotipos en los pacientes diagnosticados con leucemia y 12 en los donadores; mientras para el grupo control, únicamente se muestran las frecuencias de aquellos genotipos que aparecen tanto en pacientes leucémicos y donadores. Los genotipos 69 y 70 no fueron identificados en pacientes leucémicos, al igual que los genotipos 8 y 74 en el grupo control; mientras el genotipo 76 únicamente se encontró en los donadores.

Tabla 7. Frecuencias de genotipos KIR en pacientes Mexicanos con leucemia.

	Genes KIR															# GENOTIPO	(%)	
	Grupo A				Grupo B						Genes marco / Pseudogenes							
	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1			3DP1
P r e - T C P H n=32																	1	31.3
																	2	21.9
																	3	18.8
																	4	9.4
																	5	3.1
																	6	3.1
																	7	6.3
																	8	3.1
																74	3.1	
D o n a d o r e s n=32																	1	21.9
																	2	15.6
																	3	15.6
																	4	9.4
																	5	12.5
																	6	3.1
																	7	3.1
																	8	3.1
																69	3.1	
																70	6.3	
																74	3.1	
																76	3.1	
C o n t r o l e s n=120																	1	41.7
																	2	15.0
																	3	7.5
																	4	13.3
																	5	2.5
																	6	0.8
																	7	4.2
																	69	0.8
																70	0.8	

Genotipos KIR reportados en <http://allelefreqencies.net>. La presencia del gen dentro del genotipo se indica mediante un recuadro sombreado; mientras la ausencia se muestra por un cuadro blanco.

*: Frecuencias de genotipos KIR en población mexicana reportados por Hernández. E. (2008), %: Porcentaje de la frecuencia de genotipos KIR, KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor, TCPH: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Todos los genotipos contienen entre nueve (genotipo 1) y 16 genes por individuo (genotipo 6). El genotipo 2 (KIR3DL1, 2DL1, 2DL3, 2DS4, 2DL5, 3DS1, 2DS1, 2DS5, 2DL4, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1) correspondiente a un haplotipo AB y el genotipo 1 (KIR3DL1, 2DL1, 2DL3, 2DS4, 2DL4, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1) propio de un haplotipo homocigoto A, fueron los más frecuentes; los cuales representan más del 50% de los genotipos presentes en los pacientes con leucemia y el grupo control, en comparación con el 37.5% en los donadores. Sin encontrar variación significativa ($p > 0.05$) en alguno de los genotipos presentes en estos grupos de estudio.

9.4.2. Pacientes con TCPH

Dentro de la **Tabla 8** están representados los genotipos determinados en pacientes con TCPH, los genes que conforman dichos genotipos; así como las frecuencias de cada uno de ellos.

Tabla 8. Frecuencias de genotipos KIR en pacientes Mexicanos con TCPH.

	Genes KIR																# GENOTIPO	(%)
	Grupo A				Grupo B						Genes marco / Pseudogenes							
	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1		
P r e - T C P H n=37																	1	32.4
																	2	24.3
																	3	16.2
																	4	5.4
																	5	5.4
																	6	5.4
																	7	5.4
																	8	2.7
																	74	2.7
P o s - T C P H n=37																	1	24.3
																	2	13.5
																	3	10.8
																	4	10.8
																	5	5.4
																	6	5.4
																	7	10.8
																	8	5.4
																	28	2.7
																69	5.4	
																74	2.7	
																76	2.7	
D o n a d o r e s n=37																	1	24.3
																	2	13.5
																	3	10.8
																	4	8.1
																	5	10.8
																	6	2.7
																	7	5.4
																	8	5.4
																	28	2.7
																69	5.4	
																70	5.4	
																74	2.7	
																76	2.7	

Genotipos KIR reportados en <http://allelefrequencies.net>. La presencia del gen dentro del genotipo se indica mediante un recuadro sombreado; mientras la ausencia se muestra por un cuadro blanco.

#: Porcentaje de la frecuencia de genotipos KIR, **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor, **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Fueron 9 los genotipos identificados durante la etapa previa al trasplante, 12 genotipos los observados en los pacientes trasplantados y 13 genotipos descritos en los donadores. Los genotipos 28, 69 y 76 no se identificaron antes del trasplante ya que se adquirieron del donador después del mismo; mientras el genotipo 70 sólo se encontró en los donadores. Se observó que las frecuencias genotípicas previas al trasplante, se ven modificadas por la carga genética del donador una vez realizado el TCPH.

9.4.3. Pacientes sin EICH.

En la **Tabla 9** se describen los genotipos de pacientes que no desarrollaron EICH tras recibir un TCPH, los genes que conforman dichos genotipos; así como sus frecuencias.

Tabla 9. Frecuencia de genotipos KIR en pacientes sin EICH.

	Genes KIR																# GENOTIPO	(%)
	Grupo A				Grupo B						Genes marco / Pseudogenes							
	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1		
Pre-TCPH n=9																	1	33.3
																	2	33.3
																	3	11.1
																	6	11.1
																	7	11.1
Pos-TCPH n=9																	1	22.2
																	2	22.2
																	3	22.2
																	6	22.2
																	7	11.1
Donadores n=9																	1	22.2
																	2	22.2
																	3	22.2
																	5	11.1
																	6	11.1
																70	11.1	

Genotipos KIR reportados en <http://allelefrecuencias.net>. La presencia del gen dentro del genotipo se indica mediante un recuadro sombreado; mientras la ausencia se muestra por un cuadro blanco.

#: Porcentaje de la frecuencia de genotipos KIR, **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor, **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Después de comparar las frecuencias genotípicas de pacientes sin Enfermedad de Injerto contra Hospedero con las frecuencias encontradas en pacientes con EICH posterior al TCPH, no se encontró variación significativa ($p > 0.05$) para ningún genotipo KIR.

9.4.4. Pacientes con EICH.

Los genotipos identificados en pacientes con EICH, los genes que conforman cada uno; así como sus frecuencias se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Frecuencia de genotipos KIR en pacientes que desarrollaron EICH.

	Genes KIR																# GENOTIPO	%
	Grupo A				Grupo B						Genes marco / Pseudogenes							
	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1		
P r e - T C P H n=28																	1	32.1
																	2	21.4
																	3	17.9
																	4	7.1
																	5	7.1
																	6	3.6
																	7	3.6
																	8	3.6
																74	3.6	
P o s - T C P H n=28																	1	25.0
																	2	10.7
																	3	7.1
																	4	14.3
																	5	7.1
																	7	10.7
																	8	7.1
																	28	3.6
																69	7.1	
																74	3.6	
																76	3.6	
D o n a d o r e s n=28																	1	25.0
																	2	10.7
																	3	7.1
																	4	10.7
																	5	10.7
																	7	7.1
																	8	7.1
																	28	3.6
																69	7.1	
																70	3.6	
																74	3.6	
																76	3.6	

Genotipos KIR reportados en <http://allelefrequencias.net>. La presencia del gen dentro del genotipo se indica mediante un recuadro sombreado; mientras la ausencia se muestra por un cuadro blanco.

#: Porcentaje de la frecuencia de genotipos KIR, **KIR**: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor, **TCPH**: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Los resultados de pacientes con EICH se contrastaron con la etapa previa al trasplante, observando que no existe variación significativa ($p > 0.05$) para ningún genotipo KIR.

9.4.5. Pacientes con EICH aguda y crónica.

Los genotipos identificados en pacientes que después de un TCPH desarrollaron EICHa previamente a una crónica; así como los genes y las frecuencias de cada uno de ellos se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Frecuencia de genotipos KIR en pacientes que desarrollaron EICH aguda.

	Genes KIR															# GENOTIPO	%		
	Grupo A				Grupo B						Genes marco / Pseudogenes								
	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1			3DP1	
Pre-TCPH n=8																	1	37.5	
																	2	50.0	
																	3	12.5	
Pos-TCPH n=8																	1	37.5	
																	2	25.0	
																	7	12.5	
																		69	25.0
Donadores n=8																	1	37.5	
																	2	25.0	
																		69	25.0
																		70	12.5

Genotipos KIR reportados en <http://allelefrequencies.net>. La presencia del gen dentro del genotipo se indica mediante un recuadro sombreado; mientras la ausencia se muestra por un cuadro blanco.

#: Porcentaje de la frecuencia de genotipos KIR, KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor, TCPH: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Las frecuencias genotípicas de los pacientes trasplantados que desarrollaron EICHa se contrastaron con la etapa previa al trasplante, sin encontrar variación significativa ($p > 0.05$) para ningún genotipo KIR.

En la **Tabla 12** están representados los genotipos KIR identificados en pacientes que desarrollaron únicamente EICHe posterior al TCPH; así como los genes que conforman los diferentes genotipos y las frecuencias de cada uno de ellos.

Tabla 12. Frecuencia de genotipos KIR en pacientes que desarrollaron EICH crónica.

		Genes KIR															# GENOTIPO	(%)	
		Grupo A				Grupo B						Genes marco / Pseudogenes							
		3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1			3DP1
P r e - T C P H n=20																		1	30.0
																		2	10.0
																		3	20.0
																		4	10.0
																		5	10.0
																		6	5.0
																		7	5.0
																		8	5.0
																		74	5.0
P o s - T C P H n=20																		1	20.0
																		2	5.0
																		3	10.0
																		4	20.0
																		5	10.0
																		7	10.0
																		8	10.0
																		28	5.0
																		74	5.0
																	76	5.0	
D o n a d o r e s n=20																		1	20.0
																		2	5.0
																		3	10.0
																		4	15.0
																		5	15.0
																		7	10.0
																		8	10.0
																		28	5.0
																		74	5.0
																	76	5.0	

Genotipos de KIR reportados en <http://allelefrequencies.net>. La presencia de un gen se indica mediante un recuadro sombreado, mientras la ausencia se muestra por un cuadro blanco. %: Porcentaje de la frecuencia de genotipos KIR; KIR: Killer cell Immunoglobulin-like Receptor; TCPH: Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas.

Los resultados de pacientes con EICHc se compararon con la etapa previa al trasplante, observando que no existe variación significativa ($p > 0.05$) para ningún genotipo KIR durante las diferentes etapas del trasplante.

9.5. Frecuencias haplotípicas de la porción centromérica y telomérica de KIR

Los haplotipos de la porción centromérica y telomérica de KIR se clasificaron de acuerdo con la nomenclatura reportada por *Hou L. (2012)* y *Rajalingam R. (2012)*; las cuales definen que KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 y 2DS2 son específicos para la porción centromérica, KIR3DL1, 3DS1, 2DS1 y 2DS4 son propios de la porción telomérica; mientras KIR2DL5, 2DS3 y 2DS5 se pueden encontrar en ambos segmentos del haplotipo.

Con base en las características descritas por estas dos nomenclaturas, se analizó cada uno de los genotipos para definir ambas porciones del haplotipo. Los porcentajes de las frecuencias haplotípicas de la porción centromérica y telomérica de KIR observados dentro de nuestra población de estudio, se encuentran descritos en cada una de las siguientes tablas.

9.5.1. Pacientes con TCPH

Los haplotipos de la porción centromérica y telomérica de KIR identificados en los pacientes con TCPH; así como las frecuencias y los genes que conforman cada uno de ellos se muestran en la **Tabla 13** y **Tabla 14**.

Se determinó la presencia de tres haplotipos (A1, B1 y B2) reportados por *Hou L. (2012)* y cuatro (AC1, BC1, BC2 y BC4) descritos por *Rajalingam R. (2012)* en la porción centromérica (**Tabla 13**); mientras en la porción correspondiente al telómero se identificaron dos haplotipos (A1 y B1) reportados por *Hou L. (2012)* y tres haplotipos (AT1, BT1 y BT7) descritos por *Rajalingam R. (2012)*. Dentro de esta porción un haplotipo denominado Bx o BTx no se encontró definido por ninguna de las dos nomenclaturas (**Tabla 14**); este nuevo haplotipo presentó los genes *KIR2DS3* y *KIR2DS5* dentro de la porción telomérica de KIR y se encontró con una frecuencia del 1.3% dentro de nuestra población de estudio (en un donador y su receptor después del trasplante).

Tabla 13. Frecuencias de haplotipos KIR centroméricos en pacientes Mexicanos con TCPH.

Genes KIR en porción Centromérica						Haplotipo ¹	Haplotipo ²	n=37 2n=74	Etapa
3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3				
[Diagrama de haplotipo A1: 3DL3, 2DL3, 2DP1, 2DL1, 3DP1]									
A1	AC1			78.4	Pre-TCPH				
				73.0	Pos-TCPH				
				73.0	Donadores				
[Diagrama de haplotipo B1: 3DL3, 2DS2, 2DL2, 2DL5B, 2DS3, 2DP1, 2DL1, 3DP1]									
B1	BC1			6.8	Pre-TCPH				
				10.8	Pos-TCPH				
				12.2	Donadores				
[Diagrama de haplotipo Bx: 3DL3, 2DS2, 2DL2, 2DL5B, 2DS5, 3DP1]									
Bx	BC4			2.7	Pre-TCPH				
				2.7	Pos-TCPH				
				2.7	Donadores				
[Diagrama de haplotipo B2: 3DL3, 2DS2, 2DL2, 3DP1]									
B2	BC2			12.2	Pre-TCPH				
				13.5	Pos-TCPH				
				12.2	Donadores				

Contenido genético en la porción centromérica de un haplotipos KIR. La porción centromérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, KIR2DP1 en un cuadro blanco y KIR3DP1 son pseudogenes que no expresan un receptor, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por Hou L. (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por Rajalingam R. (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción centromérica.

Tabla 14. Frecuencias de haplotipos KIR teloméricos en pacientes Mexicanos con TCPH.

Genes KIR en porción Telomérica										Haplotipo ¹	n=37 2n=74	Etapa	Haplotipo ²	n=37 2n=74	Etapa
2DL4	3DS1	3DL1	2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2							
[Diagrama de haplotipo A1: 2DL4, 3DL1, 2DS4, 3DL2]															
A1										70.3	Pre-TCPH				
										66.2	Pos-TCPH				
										64.9	Donadores				
[Diagrama de haplotipo B1: 2DL4, 3DS1, 2DL5A, 2DS3, 2DS1, 3DL2]															
B1										29.7	Pre-TCPH				
										32.4	Pos-TCPH				
										33.7	Donadores				
[Diagrama de haplotipo Bx: 2DL4, 3DS1, 2DL5A, 2DS5, 2DS1, 3DL2]															
Bx										0.0	Pre-TCPH				
										1.4	Pos-TCPH				
										1.4	Donadores				
[Diagrama de haplotipo AT1: 2DL4, 3DL1, 2DS4, 3DL2]															
AT1										70.3	Pre-TCPH				
										66.2	Pos-TCPH				
										64.9	Donadores				
[Diagrama de haplotipo BT1: 2DL4, 3DS1, 2DL5A, 2DS3, 2DS1, 3DL2]															
BT1										4.1	Pre-TCPH				
										8.1	Pos-TCPH				
										5.4	Donadores				
[Diagrama de haplotipo BT7: 2DL4, 3DS1, 2DL5A, 2DS5, 2DS1, 3DL2]															
BT7										25.6	Pre-TCPH				
										24.3	Pos-TCPH				
										28.3	Donadores				
[Diagrama de haplotipo BTx: 2DL4, 3DS1, 2DL5A, 2DS3, 2DS5, 2DS1, 3DL2]															
BTx										0.0	Pre-TCPH				
										1.4	Pos-TCPH				
										1.4	Donadores				

Contenido genético en la porción telomérica de un haplotipos KIR. La porción telomérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por Hou L. (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por Rajalingam R. (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción telomérica.

Dentro de la porción centromérica el haplotipo más frecuente fue el haplotipo A1 o AC1; mientras el haplotipo BC4 portando el gen *KIR2DS5* fue el haplotipo con menor frecuencia (**Tabla 13**). Así mismo, el haplotipo A1 o AT1 fue el haplotipo con mayor frecuencia en la porción telomérica; mientras el haplotipo BT1 portando el gen *KIR2DS3* fue el menos frecuente (**Tabla 14**).

9.5.2. Pacientes sin EICH.

Los haplotipos KIR de la porción centromérica y telomérica, los genes que conforman los diferentes haplotipos; así como las frecuencias de cada uno de ellos en pacientes que no desarrollaron EICH tras recibir un TCPH, se describen en la **Tabla 15** y **Tabla 16**; donde no se observaron variaciones significativas ($p > 0.05$) en dichas frecuencias haplotípicas.

Tabla 15. Frecuencias de haplotipos KIR centroméricos en pacientes sin EICH.

Genes KIR en porción Centromérica					Haplotipo ¹	Haplotipo ²	(%) n=9 2n=18	Etapa						
3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B					2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	
3DL3			2DL3				2DP1	2DL1	3DP1	A1	AC1	83.3	Pre-TCPH	
												72.2	Pos-TCPH	
												72.2	Donadores	
3DL3	2DS2	2DL2		2DL5B	2DS3			2DP1	2DL1	3DP1	B1	BC1	11.1	Pre-TCPH
										16.7			Pos-TCPH	
										16.7			Donadores	
3DL3	2DS2	2DL2		2DL5B		2DS5				3DP1	Bx	BC4	0.0	Pre-TCPH
										0.0			Pos-TCPH	
										0.0			Donadores	
3DL3	2DS2	2DL2								3DP1	B2	BC2	5.6	Pre-TCPH
													11.1	Pos-TCPH
													11.1	Donadores

Contenido genético en la porción centromérica de un haplotipos KIR. La porción centromérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, KIR2DP1 en un cuadro blanco y KIR3DP1 son pseudogenes que no expresan un receptor, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por *Hou L.* (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por *Rajalingam R.* (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción centromérica.

Tabla 16. Frecuencias de haplotipos KIR teloméricos en pacientes sin EICH.

Genes KIR en porción Telomérica									Haplotipo ¹	(%) n=9 2n=18	Etapa	Haplotipo ²	(%) n=9 2n=18	Etapa
2DL4	3DS1	3DL1	2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2						
2DL4		3DL1					2DS4	3DL2	A1		Pre-TCPH	AT1	66.7	Pre-TCPH
													61.1	Pos-TCPH
													61.1	Donadores
2DL4	3DS1		2DL5A	2DS3		2DS1		3DL2	B1		Pre-TCPH	BT1	5.6	Pre-TCPH
													5.6	Pos-TCPH
													0.0	Donadores
2DL4	3DS1		2DL5A		2DS5	2DS1		3DL2	Bx		Pre-TCPH	BT7	27.8	Pre-TCPH
													38.9	Pos-TCPH
													38.9	Donadores
2DL4	3DS1		2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1		3DL2	Bx		Pos-TCPH	BTx	0.0	Pre-TCPH
													0.0	Pos-TCPH
													0.0	Donadores

Contenido genético en la porción telomérica de un haplotipos KIR. La porción telomérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por *Hou L.* (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por *Rajalingam R.* (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción telomérica.

9.5.3. Pacientes con EICH.

En la **Tabla 17** y **Tabla 18** se describen los haplotipos de la porción centromérica y telomérica referidos en pacientes con EICH; así como los genes que conforman los diferentes haplotipos y las frecuencias de cada de ellos.

Tabla 17. Frecuencias de haplotipos KIR centroméricos en pacientes que desarrollaron EICH.

Genes KIR en porción Centromérica				Haplotipo ¹	Haplotipo ²	(% n=28 2n=56)	Etapa						
3DL3	2DS2	2DL2	2DL3					2DL5B	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1
3DL3			2DL3				2DP1	2DL1	3DP1	A1	AC1	76.7	Pre-TCPH
												73.2	Pos-TCPH
												73.2	Donadores
3DL3	2DS2	2DL2		2DL5B	2DS3		2DP1	2DL1	3DP1	B1	BC1	5.4	Pre-TCPH
												8.9	Pos-TCPH
												10.7	Donadores
3DL3	2DS2	2DL2		2DL5B		2DS5			3DP1	Bx	BC4	3.6	Pre-TCPH
												3.6	Pos-TCPH
												3.6	Donadores
3DL3	2DS2	2DL2							3DP1	B2	BC2	14.3	Pre-TCPH
												14.3	Pos-TCPH
												12.5	Donadores

Contenido genético en la porción centromérica de un haplotipos KIR. La porción centromérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, KIR2DP1 en un cuadro blanco y KIR3DP1 son pseudogenes que no expresan un receptor, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por *Hou L.* (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por *Rajalingam R.* (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción centromérica.

Tabla 18. Frecuencias de haplotipos KIR teloméricos en pacientes que desarrollaron EICH.

Genes KIR en porción Telomérica				Haplotipo ¹	(% n=28 2n=56)	Etapa	Haplotipo ²	(% n=28 2n=56)	Etapa			
2DL4	3DS1	3DL1	2DL5A							2DS3	2DS5	2DS1
2DL4		3DL1					2DS4	3DL2	A1	AT1	71.4	Pre-TCPH
											67.9	Pos-TCPH
											66.1	Donadores
2DL4	3DS1		2DL5A	2DS3		2DS1		3DL2	B1	BT1	28.6	Pre-TCPH
											3.6	Pre-TCPH
											8.9	Pos-TCPH
2DL4	3DS1		2DL5A		2DS5	2DS1		3DL2	B1	BT7	7.1	Donadores
											25.0	Pre-TCPH
											21.4	Pos-TCPH
2DL4	3DS1		2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1		3DL2	Bx	BTx	25.0	Donadores
											0.0	Pre-TCPH
											1.8	Pos-TCPH
2DL4	3DS1		2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1		3DL2	Bx	BTx	1.8	Donadores
											1.8	Pos-TCPH
											1.8	Donadores

Contenido genético en la porción telomérica de un haplotipos KIR. La porción telomérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por *Hou L.* (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por *Rajalingam R.* (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción telomérica.

Dentro de este grupo, no se encontraron variaciones significativas ($p > 0.05$) en las frecuencias haplotípicas de las porciones centromérica y telomérica de KIR, tras comparar el pretrasplante con el postrasplante.

9.5.4. Pacientes con EICH aguda y crónica.

La **Tabla 19** y **Tabla 20** muestran los haplotipos identificados en la porción centromérica y telomérica de KIR, los genes que conforman los diferentes haplotipos y sus frecuencias en los pacientes que después de un TCPH desarrollaron EICHa previa a una crónica.

Tabla 19. Frecuencias de haplotipos KIR centroméricos en pacientes que desarrollaron EICH aguda.

Genes KIR en porción Centromérica					Haplotipo ¹	Haplotipo ²	(%) n=8 2n=16	Etapas					
3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	A1	AC1	93.8	Pre-TCPH
3DL3			2DL3				2DP1	2DL1	3DP1			93.8	Pos-TCPH
3DL3									3DP1			93.8	Donadores
3DL3	2DS2	2DL2		2DL5B	2DS3		2DP1	2DL1	3DP1	B1	BC1	0.0	Pre-TCPH
												6.3	Pos-TCPH
												6.3	Donadores
3DL3	2DS2	2DL2		2DL5B		2DS5			3DP1	Bx	BC4	0.0	Pre-TCPH
												0.0	Pos-TCPH
												0.0	Donadores
3DL3	2DS2	2DL2							3DP1	B2	BC2	6.3	Pre-TCPH
												0.0	Pos-TCPH
												0.0	Donadores

Contenido genético en la porción centromérica de un haplotipos KIR. La porción centromérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, KIR2DP1 en un cuadro blanco y KIR3DP1 son pseudogenes que no expresan un receptor, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por Hou L. (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por Rajalingam R. (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción centromérica.

Tabla 20. Frecuencias de haplotipos KIR teloméricos en pacientes que desarrollaron EICH aguda.

Genes KIR en porción Telomérica					Haplotipo ¹	(%) n=8 2n=16	Etapas	Haplotipo ²	(%) n=8 2n=16	Etapas		
2DL4	3DS1	3DL1	2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2	A1	AT1	68.8	Pre-TCPH
2DL4		3DL1					2DS4	3DL2			56.2	Pos-TCPH
								3DL2			50.0	Donadores
2DL4	3DS1		2DL5A	2DS3		2DS1		3DL2	B1	BT1	31.2	Pre-TCPH
											6.3	Pos-TCPH
											0.0	Donadores
2DL4	3DS1		2DL5A		2DS5	2DS1		3DL2	Bx	BT7	31.2	Pre-TCPH
											37.5	Pos-TCPH
											50.0	Donadores
2DL4	3DS1		2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1		3DL2	Bx	BTx	0.0	Pre-TCPH
											0.0	Pos-TCPH
											0.0	Donadores

Contenido genético en la porción telomérica de un haplotipos KIR. La porción telomérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por Hou L. (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por Rajalingam R. (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción telomérica.

En el grupo de EICHa se encontró una variación significativa ($p > 0.05$) en las frecuencias haplotípicas de la porción telomérica y centromérica de KIR, después de compararlas con las obtenidas durante el pretrasplante.

Dentro de las **Tablas 21 y 22** se encuentran representados los haplotipos que fueron identificados en pacientes que únicamente desarrollaron EICHc posterior al TCPH; así como las frecuencias y los genes que conforman cada uno de ellos, donde no se observaron variaciones significativas ($p>0.05$) en dichas frecuencias haplotípicas.

Tabla 21. Frecuencias de haplotipos KIR centroméricos en pacientes que desarrollaron EICH crónica.

Genes KIR en porción Centromérica						Haplotipo ¹	Haplotipo ²	(% n=20 2n=40)	Etapa				
3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3					2DS5	2DP1	2DL1	3DP1
										A1	AC1	70.0	Pre-TCOH
												65.0	Pos-TCPH
												65.0	Donadores
										B1	BC1	7.5	Pre-TCPH
												10.0	Pos-TCPH
												12.5	Donadores
										Bx	BC4	5.0	Pre-TCPH
												5.0	Pos-TCPH
												5.0	Donadores
										B2	BC2	17.5	Pre-TCPH
												20.0	Pos-TCPH
												17.5	Donadores

Contenido genético en la porción centromérica de un haplotipos KIR. La porción centromérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, KIR2DP1 en un cuadro blanco y KIR3DP1 son pseudogenes que no expresan un receptor, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por *Hou L.* (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por *Rajalingam R.* (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción centromérica.

Tabla 22. Frecuencias de haplotipos KIR teloméricos en pacientes que desarrollaron EICH crónica.

Genes KIR en porción Telomérica									Haplotipo ¹	(% n=20 2n=40)	Etapa	Haplotipo ²	(% n=20 2n=40)	Etapa
2DL4	3DS1	3DL1	2DL5A	2DS3	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2						
									A1	Pre-TCPH	AT1	72.5	Pre-TCPH	
												72.5	Pos-TCPH	
												72.5	Donadores	
									B1	Pre-TCPH	BT1	5.0	Pre-TCPH	
												10.0	Pos-TCPH	
												10.0	Donadores	
									B1	Pos-TCPH	BT7	22.5	Pre-TCPH	
												15.0	Pos-TCPH	
												15.0	Donadores	
									Bx	Pre-TCPH	BTx	0.0	Pre-TCPH	
												2.5	Pos-TCPH	
												2.5	Donadores	

Contenido genético en la porción telomérica de un haplotipos KIR. La porción telomérica del haplotipo KIR está delimitada por dos genes marco o estructurales representados en azul, los genes que codifican para un receptor activador se muestran en amarillo y en recuadros morados se encuentran aquellos que codifican para receptores inhibidores. **Haplotipo¹**: Haplotipos reportados por *Hou L.* (2012). **Haplotipo²**: Haplotipos descritos por *Rajalingam R.* (2012). %: Porcentaje de las frecuencias del haplotipo KIR en la porción telomérica.

9.6. Frecuencias alélicas de KIR

El método PCR-SSP de mediana resolución diferencia dos variantes dentro de la secuencia del exón 5 de KIR2DS4 y KIR3DP1, lo cual permitió clasificar los alelos de dicho gen y pseudogen en dos grupos; el primero con las variantes que contienen su secuencia de nucleótidos completa (*KIR2DS4*001/011/014/015* o *KIR3DP1*001/002/004/007/009*) y otro con las variantes que presentan una delección de 22pb dentro de su secuencia (*KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013* o *KIR3DP1*003/005/006/008/010*). Posteriormente, el genotipo de KIR2DS4 y KIR3DP1 se obtuvo tras analizar los grupos alélicos (variantes con delección y sin delección) presentes en cada individuo. Las frecuencias alélicas y genotípicas de KIR2DS4 y KIR3DP1 se determinaron por conteo directo y se encuentran descritas en cada una de las siguientes tablas.

9.6.1. Frecuencias alélicas y genotípicas del gen *KIR2DS4*

9.6.1.1. Pacientes con TCPH.

Las frecuencias alélicas de KIR2DS4 identificadas en pacientes con diversas enfermedades hemato-oncológicas que recibieron un TCPH, se muestran en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Frecuencias alélicas de KIR2DS4 en pacientes Mexicanos con TCPH.

Grupo alélico de KIR2DS4		Pre-TCPH n=54 (%)	Pos-TCPH n=52 (%)	Donadores n=49 (%)
Variantes sin delección	<i>KIR2DS4*001/011/014/015</i>	55.6	46.2	49.0
Variantes con delección	<i>KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013</i>	44.4	53.8	51.0

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del gen *KIR2DS4*; **Variantes sin delección:** Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa del gen *KIR2DS4*; **Variantes con delección:** Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del gen *KIR2DS4*.

En los pacientes con enfermedad hemato-oncológica, las frecuencias de los alelos de KIR2DS4 que portan la delección (*KIR2DS4*003-004/006-010/012-013*) al igual que los alelos que presentan la secuencia completa del gen (*KIR2DS4*001/011/014-015*) mostraron ser similares después de recibir el TCPH, tal como se observa en la **Tabla 23**.

Las frecuencias genotípicas de KIR2DS4 encontradas en pacientes con TCPH, se describen en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Frecuencias genotípicas de KIR2DS4 en pacientes Mexicanos con TCPH.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR2DS4 n=37	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
x/x	2.7	8.1	13.5
x/F	37.8	24.3	18.9
x/D	10.8	18.9	21.6
F/F	10.8	10.8	13.5
F/D	21.6	21.6	18.9
D/D	16.2	16.2	13.5

#: Porcentaje de las frecuencias genotípicas de KIR2DS4 con base en sus grupos alélicos; **x/x**: Genotipo carente del gen *KIR2DS4*; **x/F** o **x/D**: Genotipo portando un solo alelo del gen *KIR2DS4*; **F/F** o **D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico de KIR2DS4; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de KIR2DS4; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de KIR2DS4 (*KIR2DS4*001/011/014/015*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia de KIR2DS4 (*KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013*).

Se observó que un bajo porcentaje de pacientes con enfermedad hemato-oncológica (2.7%) no porta el gen *KIR2DS4* en comparación con los donadores (13.5%); lo cual influyó en los pacientes trasplantados, incrementando a un 7.7% la frecuencia del genotipo x/x que carece de dicho (**Tabla 24**).

En los pacientes con enfermedad hemato-oncológica que portan un solo alelo del gen *KIR2DS4*, la frecuencia del genotipo x/D que agrupa las variantes con la delección de 22pb (*KIR2DS4*003-004/006-010/012-013*) es menor comparado con la del genotipo x/F que concentra los alelos *KIR2DS4*001/011/014-015* con la secuencia completa del gen (10.8% vs 37.8%). Además se percibió un incremento del genotipo x/D (hemicigoto para las variantes con delección) en pacientes trasplantados vs el pretrasplante (18.9% vs 10.8%); mientras el genotipo x/F (hemicigoto para los alelos portadores del gen completo) mostró una disminución (24.3% vs 37.8%), esto debido a la carga genética de los donadores obtenida ganada por los pacientes tras recibir el TCPH. Finalmente, las frecuencias de los genotipos portando dos alelos de KIR2DS4, no mostraron diferencias (**Tabla 24**).

9.6.1.2. Pacientes sin EICH.

En la **Tabla 25** están representadas las frecuencias de los grupos alélicos de KIR2DS4 determinadas en pacientes que no desarrollaron EICH tras recibir un TCPH, donde no se encontraron diferencias tras compararlas con los pacientes que desarrollaron EICH.

Tabla 25. Frecuencias alélica de KIR2DS4 en pacientes sin EICH.

Grupo alélico de KIR2DS4		Pre-TCPH n=12 (%)	Pos-TCPH n=12 (%)	Donadores n=11 (%)
Variantes sin delección	KIR2DS4*001/011/014/015	58.3	58.3	63.6
Variantes con delección	KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013	41.7	41.7	36.4

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del gen *KIR2DS4*; **Variantes sin delección**: Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa del gen *KIR2DS4*; **Variantes con delección**: Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del gen *KIR2DS4*.

Las frecuencias del genotipo de KIR2DS4 en pacientes sin EICH se describen en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Frecuencias genotípicas de KIR2DS4 en pacientes sin EICH.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR2DS4 n=9	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
x/x	0.0	0.0	11.1
x/F	55.6	55.6	55.6
x/D	22.2	11.1	0.0
F/F	11.1	0.0	0.0
F/D	0.0	22.2	22.2
D/D	11.1	11.1	11.1

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de KIR2DS4 con base en sus grupos alélicos; **x/x**: Genotipo carente del gen *KIR2DS4*; **x/F** o **x/D**: Genotipo portando un solo alelo del gen *KIR2DS4*; **F/F** o **D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico de KIR2DS4; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de KIR2DS4; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de KIR2DS4 (*KIR2DS4*001/011/014/015*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia de KIR2DS4 (*KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013*).

Únicamente un donador carece del gen *KIR2DS4*; mientras todos los pacientes durante ambas etapas del trasplante y sus donadores portan por lo menos una variante de KIR2DS4. En los pacientes sin EICH que portan un solo alelo de KIR2DS4, se identificaron con menor frecuencia las variantes *KIR2DS4*003-010/012-013* con la delección de 22pb, en comparación con el genotipo que presenta los alelos *KIR2DS4*001/011/014-015* portadores de la secuencia completa de gen (11.1% vs 55.6%). Sin encontrar variaciones significativas ($p > 0.05$) para ninguno de los genotipos (**Tabla 26**).

9.6.1.3. Pacientes con EICH.

En la **Tabla 27** se describen las frecuencias de los grupos alélicos del gen *KIR2DS4* encontradas en pacientes que desarrollaron EICH posterior al TCPH.

Tabla 27. Frecuencias alélicas de KIR2DS4 en pacientes que desarrollaron EICH.

Grupo alélico de KIR2DS4		Pre-TCPH n=42 (%)	Pos-TCPH n=40 (%)	Donadores n=38 (%)
Variantes sin delección	KIR2DS4*001/011/014/015	54.8	42.5	44.7
Variantes con delección	KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013	45.2	57.5	55.3

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del gen *KIR2DS4*; **Variantes sin delección:** Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa del gen *KIR2DS4*; **Variantes con delección:** Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del gen *KIR2DS4*.

Las frecuencias observadas en ambos grupos alélicos de *KIR2DS4* (variantes *KIR2DS4*003-004/006-010/012-013* que portan la delección; así como las que presentan el fragmento completo *KIR2DS4*001/011/014-015*), no mostraron variaciones significativas ($p > 0.05$) tras comparar a los pacientes que desarrollaron EICH con la etapa previa al trasplante (**Tabla 27**).

La **Tabla 28** muestra las frecuencias del genotipo de *KIR2DS4* observadas en pacientes con EICH.

Tabla 28. Frecuencias genotípicas de KIR2DS4 en pacientes que desarrollaron EICH.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR2DS4 n=28	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
x/x	3.6	10.7	14.3
x/F	32.1	14.3 ^a	7.0
x/D	10.7	21.4 ^b	28.6
F/F	10.7	14.3	17.9
F/D	28.6	21.4	17.9
D/D	14.3	17.9	14.3

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de *KIR2DS4* con base en sus grupos alélicos; **x/x:** Genotipo carente del gen *KIR2DS4*; **x/F o x/D:** Genotipo portando un solo alelo del gen *KIR2DS4*; **F/F o D/D:** Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico de *KIR2DS4*; **F:** Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de *KIR2DS4* (*KIR2DS4*001/011/014/015*); **D:** Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia de *KIR2DS4* (*KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013*).

Pre-TCPH vs. Pos-TCPH: ^a($p=0.003$, OR=0.4, 0.2-0.7), ^b($p=0.03$, OR=2.4, 1.1-5.4) IC95%

En las muestras que portan obligatoriamente un solo alelo del gen *KIR2DS4*, se percibió un incremento del genotipo x/D (hemicigoto para las variantes con delección *KIR2DS4*003-004/006-010/012-013*) en pacientes que desarrollaron EICH comparado con el pretrasplante (21.4% vs 10.7%); mientras el genotipo x/F (hemicigoto para los alelos portadores del gen completo *KIR2DS4*001/011/014/015*) mostró una disminución (14.3% vs 32.1%), observándose una variación estadística ($p < 0.05$) sobre dichos genotipos. Pero no se observaron diferencias en las frecuencias de los genotipos portando dos alelos del gen *KIR2DS4* (**Tabla 28**).

9.6.1.4. Pacientes con EICH aguda y crónica.

La **Tabla 29** muestra los grupos alélicos de *KIR2DS4* identificados en los pacientes que después de un TCPH desarrollaron EICHa previamente a una crónica.

Tabla 29. Frecuencias alélicas de *KIR2DS4* en pacientes que desarrollaron EICH aguda.

Grupo alélico de <i>KIR2DS4</i>		Pre-TCPH n=11 (%)	Pos-TCPH n=10 (%)	Donadores n=8 (%)
Variantes sin delección	<i>KIR2DS4*001/011/014/015</i>	63.3	50.0	50.0
Variantes con delección	<i>KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013</i>	36.4	50.0	50.0

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del gen *KIR2DS4*; **Variantes sin delección:** Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa del gen *KIR2DS4*; **Variantes con delección:** Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del gen *KIR2DS4*.

Al comparar las frecuencias de ambos grupos alélicos de *KIR2DS4* (variantes *KIR2DS4*003-004/006-010/012-013* que portan la delección; así como las que presentan el fragmento completo del gen *KIR2DS4*001/011/014-015*) de los pacientes que desarrollaron EICHa con la etapa pretrasplante, no mostraron diferencias (**Tabla 29**).

En la **Tabla 30** se describen las frecuencias del genotipo de *KIR2DS4* observadas en pacientes que desarrollaron EICHa.

Tabla 30. Frecuencias genotípicas de KIR2DS4 en pacientes que desarrollaron EICH aguda.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR2DS4 n=9	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
x/x	0.0	25.0	37.8
x/F	50.0	12.5	12.5
x/D	12.5	12.5	12.5
F/F	12.5	12.5	12.5
F/D	12.5	25.0	12.5
D/D	12.5	12.5	12.5

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de KIR2DS4 con base en sus grupos alélicos; **x/x**: Genotipo carente del gen *KIR2DS4*; **x/F** o **x/D**: Genotipo portando un solo alelo del gen *KIR2DS4*; **F/F** o **D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico de KIR2DS4; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de KIR2DS4; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de KIR2DS4 (*KIR2DS4*001/011/014/015*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia de KIR2DS4 (*KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013*).

Un 37.8% de los donadores carece del gen *KIR2DS4*; esto influyó sobre la carga genética de los pacientes trasplantados que desarrollaron EICHa, pues el 25.0% de ellos perdieron dicho gen después de recibir el trasplante, ya que todos estos pacientes durante la etapa previa al trasplante tenían por lo menos un alelo del gen *KIR2DS4*. En cuanto a las muestras que portan un solo alelo del gen *KIR2DS4*, al igual que para aquellas portando dos alelos, no se encontraron variaciones significativas ($p > 0.05$) en sus frecuencias dentro de este grupo de pacientes (**Tabla 30**).

De igual forma en la **Tabla 31** están representados los grupos alélicos de KIR2DS4 identificados en pacientes que desarrollaron únicamente EICHc, donde no se encontraron variaciones significativas ($p > 0.05$).

Tabla 31. Frecuencias alélicas de KIR2DS4 en pacientes que desarrollaron EICH crónica.

Grupo alélico de KIR2DS4		Pre-TCPH n=31 (%)	Pos-TCPH n=31 (%)	Donadores n=30 (%)
Variantes sin delección	KIR2DS4*001/011/014/015	48.7	41.9	43.3
Variantes con delección	KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013	51.6	58.1	56.7

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del gen *KIR2DS4*; **Variantes sin delección**: Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa del gen *KIR2DS4*; **Variantes con delección**: Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del gen *KIR2DS4*.

Las frecuencias del genotipo de KIR2DS4 observadas en pacientes que desarrollaron EICHc se muestran en la **Tabla 32**.

Tabla 32. Frecuencias genotípicas de KIR2DS4 en pacientes que desarrollaron EICH crónica.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR2DS4 n=20	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
x/x	5.0	5.0	5.0
x/F	25.0	5.0 ^a	5.0
x/D	10.0	30.0 ^b	35.0
F/F	10.0	15.0	20.0
F/D	30.0	30.0	20.0
D/D	20.0	15.0	15.0

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de KIR2DS4 con base en sus grupos alélicos; **x/x**: Genotipo carente del gen *KIR2DS4*; **x/F** o **x/D**: Genotipo portando un solo alelo del gen *KIR2DS4*; **F/F** o **D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico de *KIR2DS4*; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de *KIR2DS4*; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de *KIR2DS4* (*KIR2DS4*001/011/014/015*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia de *KIR2DS4* (*KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013*).

Se encontró que sólo el 5.0% de los pacientes durante ambas etapas del trasplante y sus donadores carecen del gen *KIR2DS4*; mientras el resto tienen por lo menos un alelo de dicho gen (**Tabla 32**).

De las muestras acarreado únicamente un alelo del gen *KIR2DS4*, se encontró que en los pacientes que desarrollaron EICHc fue mayor la frecuencia del genotipo x/D portador de los alelos *KIR2DS4*003-004/006-010/012-013* con delección (30.0%), en comparación con el genotipo x/F que exhibe los alelos *KIR2DS4*001/011/014-015* acarreado la secuencia completa del gen (5.0%). Se observó un incremento del genotipo x/D (hemicigoto para los alelos con delección) en los pacientes con EICHc comparado con la etapa previa al trasplante (30.0% vs 10.0%); mientras que para el genotipo x/F (hemicigoto para los alelos portando la secuencia completa) mostró una disminución en su frecuencia (5.0% vs 25.0%), encontrando una variación significativa ($p < 0.05$) en los pacientes con EICHc portando tales alelos. Sin embargo, no se observaron diferencias en las frecuencias de los genotipos acarreado dos alelos de *KIR2DS4* (**Tabla 32**).

9.6.2. Frecuencias alélicas del pseudogen *KIR3DP1*

9.6.2.1. Pacientes con TCPH.

Las frecuencias alélicas de *KIR3DP1* identificadas en pacientes con diversas enfermedades hemato-oncológicas que recibieron un TCPH, se muestran en la **Tabla 33**.

Tabla 33. Frecuencias alélicas de *KIR3DP1* en pacientes Mexicanos con TCPH.

Grupo alélico de <i>KIR3DP1</i>		Pre-TCPH n=74 (%)	Pos-TCPH n=74 (%)	Donadores n=74 (%)
Variantes sin delección	<i>KIR3DP1*001/002/004/007/009</i>	9.5	13.5	12.2
Variantes con delección	<i>KIR3DP1*003/005/006/008/010</i>	90.5	86.5	87.8

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del pseudogen *KIR3DP1*; **Variantes sin delección**: Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa de *KIR3DP1*; **Variantes con delección**: Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1*.

En los pacientes con enfermedad hemato-oncológica, las frecuencias de los alelos de *KIR3DP1* que portan la delección (*KIR3DP1*003/005-006/008/010*) al igual que los alelos que presentan la secuencia completa del gen (*KIR3DP1*001-002/004/007/009*) mostraron ser similares después de recibir el TCPH. Tal como se observa en la **Tabla 32**, fue mayor la frecuencia de los alelos *KIR3DP1*003/005-006/008/010* portando la delección en comparación con la frecuencia de los alelos *KIR3DP1*001-002/004/007/009* que presentan la secuencia completa del pseudogen (9.5% vs 90.5%).

Las frecuencias del genotipo de *KIR3DP1* encontradas en pacientes con TCPH, se describen en la **Tabla 34**.

Tabla 34. Frecuencias genotípicas de *KIR3DP1* en pacientes Mexicanos con TCPH.

Genotipos con base en los grupos alélicos de <i>KIR3DP1</i> n=37	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
F/F	0.0	0.0	0.0
F/D	18.9	27.0	24.3
D/D	81.1	73.0	75.7

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de *KIR3DP1* con base en sus grupos alélicos; **F/F o D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico del pseudogen *KIR3DP1*; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de *KIR3DP1*; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de *KIR3DP1* (*KIR3DP1*001-002/004/007/009*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1* (*KIR3DP1*003/005-006/008/010*).

En cuanto a los genotipos del pseudogen *KIR3DP1* encontrados en pacientes con enfermedad hemato-oncológica, se determinó que todas las muestras poseen dos alelos de este pseudogen. Sin embargo, no se encontraron muestras con un genotipo F/F portando dos alelos que contienen la secuencia completa de *KIR3DP1* (*KIR3DP1*001-002/004/007/009*), encontrando con mayor frecuencia el genotipo D/D portador de dos alelos *KIR3DP1*003/005-006/008/010* con la delección de 22pb (81.1% vs 18.9%), en comparación con el genotipo heterocigoto F/D (*KIR3DP1*001-002/004/007/009* - *KIR3DP1*003/005-006/008/010*) que porta dos alelos del pseudogen *KIR3DP1* pertenecientes a un grupo alélico diferente (**Tabla 34**).

9.6.2.2. Pacientes sin EICH.

Las frecuencias de los grupos alélicos de *KIR3DP1* determinados en pacientes que no desarrollaron EICH tras recibir un TCPH se describen en la **Tabla 35**.

Tabla 35. Frecuencias alélicas de *KIR3DP1* en pacientes sin EICH.

Grupo alélico de <i>KIR3DP1</i>		Pre-TCPH n=18 (%)	Pos-TCPH n=18 (%)	Donadores n=18 (%)
Variantes sin delección	<i>KIR3DP1*001/002/004/007/009</i>	5.6	11.1	11.1
Variantes con delección	<i>KIR3DP1*003/005/006/008/010</i>	94.4	88.9	88.9

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del pseudogen *KIR3DP1*; **Variantes sin delección**: Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa de *KIR3DP1*; **Variantes con delección**: Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1*.

No se encontraron variaciones significativas ($p > 0.05$) para las frecuencias observadas en ambos grupos alélicos del pseudogen *KIR3DP1* (variantes *KIR3DP1*003/005-006/008/010* que portan la delección de 22pb; así como las que presentan el fragmento completo del pseudogen *KIR3DP1*001-002/004/007/009*), al comparar a los pacientes que no desarrollaron EICH con la etapa pretrasplante (**Tabla 35**).

Las frecuencias del genotipo de KIR3DP1 observadas en pacientes sin EICH se describen en la **Tabla 36**, sin encontrar diferencias dentro de este grupo.

Tabla 36. Frecuencias genotípicas de KIR3DP1 en pacientes sin EICH.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR3DP1 n=9	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
F/F	0.0	0.0	0.0
F/D	11.1	22.2	22.2
D/D	88.9	77.8	77.8

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de KIR3DP1 con base en sus grupos alélicos; **F/F o D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico del pseudogen *KIR3DP1*; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de KIR3DP1; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de KIR3DP1 (*KIR3DP1*001-002/004/007/009*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1* (*KIR3DP1*003/005-006/008/010*).

9.6.2.3. Pacientes con EICH.

En la **Tabla 37** se encuentran las frecuencias alélicas del pseudogen *KIR3DP1* identificadas en pacientes con EICH.

Tabla 37. Frecuencias alélicas de KIR3DP1 en pacientes que desarrollaron EICH.

Grupo alélico de KIR3DP1		Pre-TCPH n=40 (%)	Pos-TCPH n=40 (%)	Donadores n=40 (%)
Variantes sin delección	<i>KIR3DP1*001/002/004/007/009</i>	10.6	14.3	12.5
Variantes con delección	<i>KIR3DP1*003/005/006/008/010</i>	89.3	85.7	87.5

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del pseudogen *KIR3DP1*; **Variantes sin delección**: Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa de KIR3DP1; **Variantes con delección**: Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1*.

Las frecuencias observadas en ambos grupos alélicos de KIR3DP1 (variantes *KIR3DP1*003/005-006/008/010* que portan la delección, así como las que presentan el fragmento completo del gen *KIR3DP1*001-002/004/007/009*), no mostraron variaciones significativas ($p>0.05$) tras comparar los pacientes que desarrollaron EICH con la etapa previa al trasplante (**Tabla 37**).

Las frecuencias del genotipo de KIR3DP1 encontradas en pacientes que desarrollaron EICH, se muestran en la **Tabla 38**; donde no se encontraron diferencias al compararlas con las frecuencias del pretrasplante

Tabla 38. Frecuencias genotípicas de KIR3DP1 en pacientes que desarrollaron EICH.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR3DP1 n=28	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
F/F	0.0	0.0	0.0
F/D	21.4	28.6	25.0
D/D	78.6	71.4	75.0

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de KIR3DP1 con base en sus grupos alélicos; **F/F o D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico del pseudogen *KIR3DP1*; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de KIR3DP1; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de KIR3DP1 (*KIR3DP1*001-002/004/007/009*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1* (*KIR3DP1*003/005-006/008/010*).

9.6.2.4. Pacientes con EICH aguda y crónica.

La **Tabla 39** muestra la frecuencia de los grupos alélicos de KIR3DP1 identificados en los pacientes que después de un TCPH desarrollaron EICHa previamente a una crónica.

Tabla 39. Frecuencias alélicas de KIR3DP1 en pacientes que desarrollaron EICH aguda.

Grupo alélico de KIR3DP1		Pre-TCPH n=16 (%)	Pos-TCPH n=16 (%)	Donadores n=16 (%)
Variantes sin delección	<i>KIR3DP1*001-002/004/007/009</i>	6.3	0.0	0.0
Variantes con delección	<i>KIR3DP1*003/005-006/008/010</i>	93.8	100.0	100.0

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del pseudogen *KIR3DP1*; **Variantes sin delección**: Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa de KIR3DP1; **Variantes con delección**: Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1*.

Aunque para los grupos alélicos de KIR3DP1 no se observaron diferencias entre las frecuencias de pacientes con enfermedad aguda después de compararlas con la etapa del pretrasplante, se encontró que las variantes *KIR3DP1*003/005-006/008/010*, con la delección de 22pb fueron las más frecuentes en el grupo de EICHa (**Tabla 39**).

Las frecuencias del genotipo de KIR3DP1 observadas en pacientes que desarrollaron EICHa se observan en la **Tabla 40**, las cuales no mostraron diferencias dentro de esta población de estudio.

Tabla 40. Frecuencias genotípicas de KIR3DP1 en pacientes que desarrollaron EICH aguda.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR3DP1 n=9	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
F/F	0.0	0.0	0.0
F/D	12.5	0.0	0.0
D/D	87.5	100.0	100.0

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de KIR3DP1 con base en sus grupos alélicos; **F/F o D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico del pseudogen *KIR3DP1*; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de KIR3DP1; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de KIR3DP1 (*KIR3DP1*001-002/004/007/009*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1* (*KIR3DP1*003/005-006/008/010*).

De igual forma en la **Tabla 41** están representados los grupos alélicos de KIR3DP1 identificados en pacientes que desarrollaron únicamente EICHc, donde no se encontraron variaciones significativas ($p>0.05$).

Tabla 41. Frecuencias alélicas de KIR3DP1 en pacientes que desarrollaron EICH crónica.

Grupo alélico de KIR3DP1		Pre-TCPH n=40 (%)	Pos-TCPH n=40 (%)	Donadores n=40 (%)
Variantes sin delección	KIR3DP1*001/002/004/007/009	12.5	20.0	17.5
Variantes con delección	KIR3DP1*003/005/006/008/010	87.5	80.0	82.5

%; Porcentaje de las frecuencias alélicas del pseudogen *KIR3DP1*; **Variantes sin delección**: Grupo de alelos que contienen la secuencia de nucleótidos completa de KIR3DP1; **Variantes con delección**: Grupo de alelos que han perdido 22pb de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1*.

Las frecuencias del genotipo de KIR3DP1 observadas en pacientes que desarrollaron EICHc se muestran en la **Tabla 42**.

Tabla 42. Frecuencias genotípicas de KIR3DP1 en pacientes que desarrollaron EICH crónica.

Genotipos con base en los grupos alélicos de KIR3DP1 n=20	Pre-TCPH (%)	Pos-TCPH (%)	Donadores (%)
F/F	0.0	0.0	0.0
F/D	25.0	40.0 ^a	35.0
D/D	75.0	60.0 ^b	65.0

%; Porcentaje de las frecuencias genotípicas de KIR3DP1 con base en sus grupos alélicos; **F/F o D/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico del pseudogen *KIR3DP1*; **F/D**: Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de KIR3DP1; **F**: Grupo de alelos que presentan la secuencia completa de KIR3DP1 (*KIR3DP1*001-002/004/007/009*); **D**: Grupo de alelos que tienen una delección de 22pb dentro de la secuencia del pseudogen *KIR3DP1* (*KIR3DP1*003/005-006/008/010*).

Pre-TCPH vs. Pos-TCPH: ^a($p=0.02$, OR=2.0, 1.1-3.7), ^b($p=0.02$, OR=0.5, 0.3-0.9) IC95%.

Para los genotipos del pseudogen *KIR3DP1*, se encontró que en los pacientes con EICH crónica desarrollada posterior al TCPH, la frecuencia del genotipo D/D con dos alelos *KIR3DP1*003/005-006/008/010* portadores de la delección disminuyó en comparación con el pretrasplante (60.0% vs 75.0%); mientras el genotipo F/D con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de *KIR3DP1* mostraron un incremento (40.0% vs 25.0%), debido a la carga genética de los donadores (**Tabla 41**), manifestándose variaciones significativas ($p < 0.05$) para dichos genotipos elaborados con base en los grupos alélicos del pseudogen *KIR3DP1*.

9.7. Evaluación del Quimerismo mediante genes y alelos *KIR*

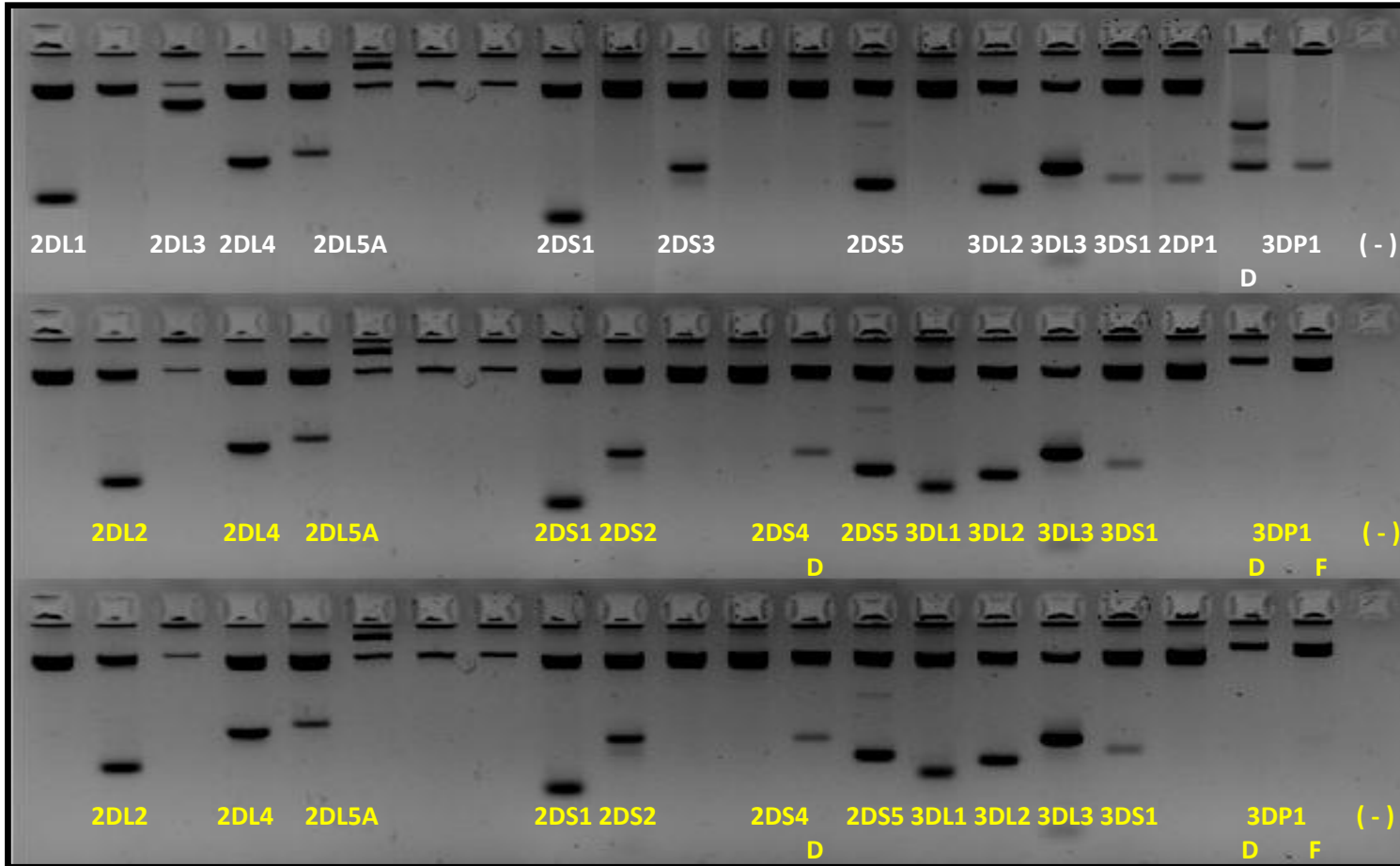
El método PCR-SSP de mediana resolución, permitió determinar la presencia o ausencia de los 15 genes y dos pseudogenes *KIR*, además de distinguir dos grupos alélicos de *KIR2DS4* y *KIR3DP1* (alelos portando la secuencia completa y la delección de 22pb) para evaluar el quimerismo hematopoyético en los 37 pacientes que recibieron un TCPH, tras comparar la carga genética obtenida en el postrasplante con la previa al trasplante y la de su donador relacionado.

Los productos de PCR sobre un gel de agarosa al 2% de tres binomios donador-receptor con diferente tipo de quimerismo se encuentran representados en las **Fig. 12, 13 y 14**; donde se observó que puede existir un contenido de genes *KIR* idéntico entre hermanos (**Fig. 14**) o una diferencia de estos genes entre ellos (**Fig. 12-13**).

En el binomio donador-receptor descrito en la **Fig. 12**, se ejemplificó un paciente trasplantado presentando un quimerismo total, en el que aparentemente todas las células hematopoyéticas presentes después del trasplante proceden del donador; ya que el contenido de genes *KIR* en el receptor postrasplante es idéntico al de su donador pero totalmente diferente al del receptor pretrasplante.

La **Fig. 13** muestra un binomio donador-receptor donde se observó un paciente trasplantado con quimerismo parcial, en el que coexisten células hematopoyéticas del receptor previas al trasplante y de su donador; ya que el contenido de genes *KIR* en el receptor postrasplante es una mezcla de ambos, siendo diferentes a nivel genético el receptor sin trasplante y su donador. Mientras, dentro del binomio donador-receptor presentado en la **Fig. 14**, se mostró un paciente trasplantado en el que no fue posible establecer el origen de las células hematopoyéticas; debido a que el contenido de genes *KIR* antes del trasplante es idéntico al de su donador, por lo que para poder establecer su tipo de quimerismo fue necesario analizar las variantes de *KIR2DS4* y *KIR3DP1* en cada binomio y comparar los alelos *KIR* del receptor trasplantado con los previos al trasplante y de su donador respectivo.

Binomio Donador-Receptor 1



Receptor antes del trasplante

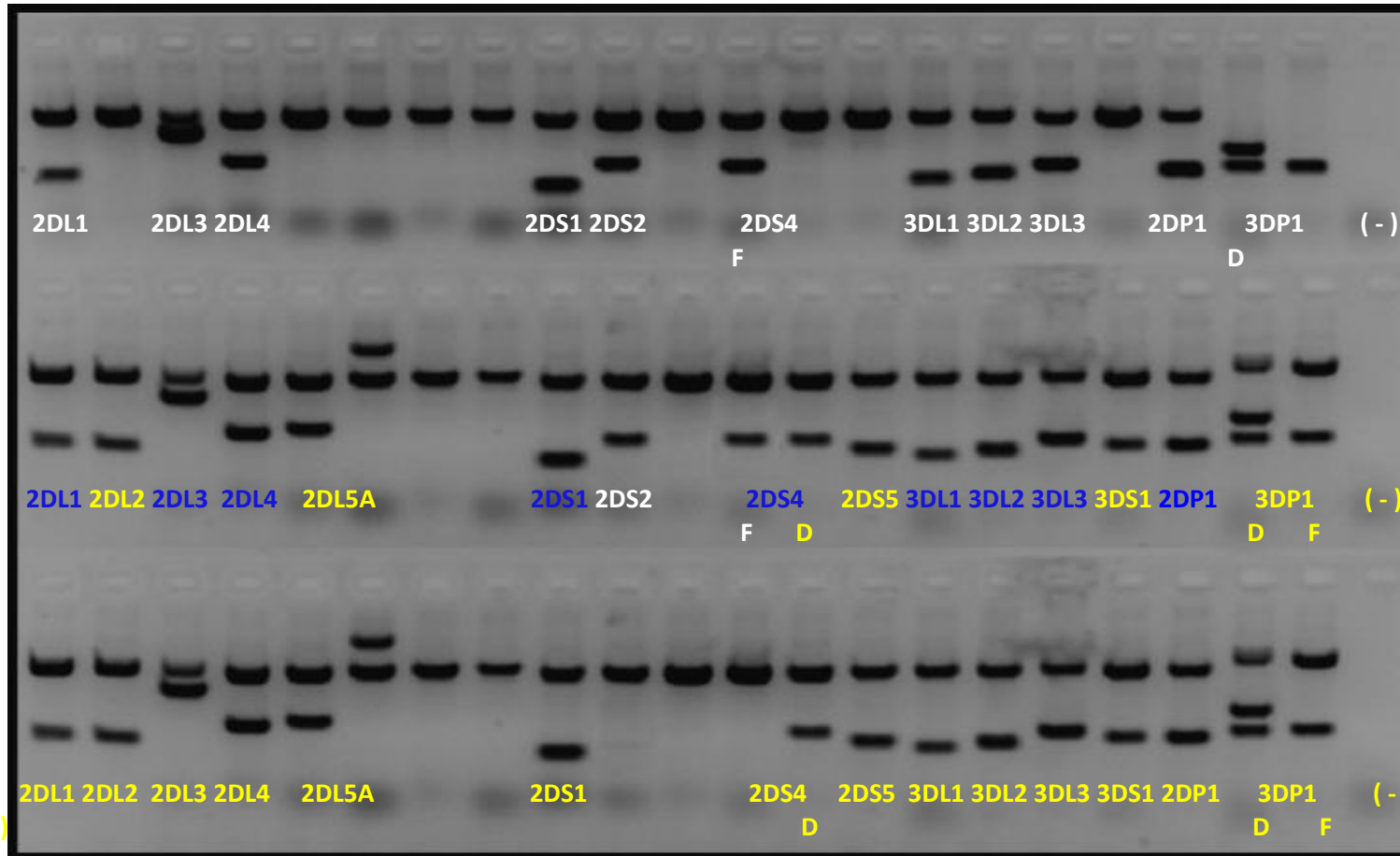
Receptor con TCPH

Donador de CPH

Receptor pos-TCPH con quimerismo total.

Figura 12. Genotipificación de KIR. Geles de agarosa al 2% con productos de PCR correspondientes a genes *KIR* obtenidos por la Técnica de PCR-SSP, donde cada pozo o grupo de ellos describen un gen; mientras el control interno de 800pb o 200pb y control negativo indican que la reacción se realizó correctamente. Pozos que presentan una banda con el peso determinado se tomaron como positivas y se establecieron como negativas aquellas en donde únicamente el control interno está presente. Específicamente los pozos 12-13 determinan las variantes de *KIR2DS4*; mientras 20-21 los alelos de *KIR3DP1*; de los cuales el grupo de alelos *KIR2DS4*001/011/014-015* o *KIR3DP1*001-002/004/007/009* que codifican el gen completo están identificados como F (*Full*); mientras el grupo de alelos que presentan la delección de 22pb dentro de su secuencia *KIR2DS4*003-004/006-010/012-013* y *KIR3DP1*003/005-06/008/010* se etiquetaron como D (*Delección*).

Binomio Donador-Receptor 2



Receptor antes del trasplante

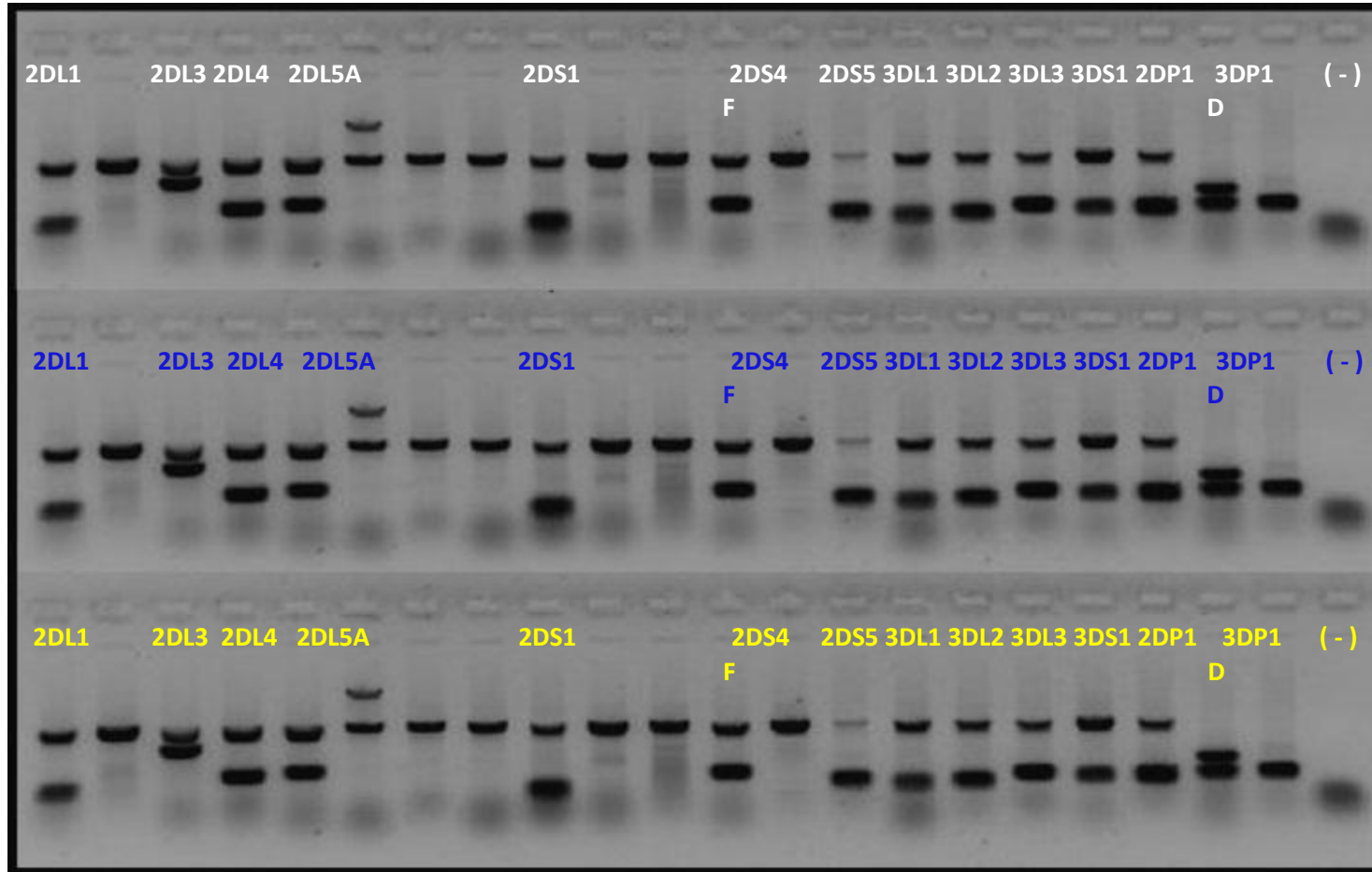
Receptor con TCPH

Donador de CPH

Binomio donador-receptor pos-TCPH con quimerismo parcial.

Figura 13. Genotipificación de KIR. Geles de agarosa al 2% con productos de PCR correspondientes a genes *KIR* obtenidos por la Técnica de PCR-SSP, donde cada pozo o grupo de ellos describen un gen; mientras el control interno de 800pb o 200pb y control negativo indican que la reacción se realizó correctamente. Pozos que presentan una banda con el peso determinado se tomaron como positivas y se establecieron como negativas aquellas en donde únicamente el control interno está presente. Específicamente los pozos 12-13 determinan las variantes de *KIR2DS4*; mientras 20-21 los alelos de *KIR3DP1*; de los cuales el grupo de alelos *KIR2DS4*001/011/014-015* o *KIR3DP1*001-002/004/007/009* que codifican el gen completo están identificados como F (Full); mientras el grupo de alelos que presentan la deleción de 22pb dentro de su secuencia *KIR2DS4*003-004/006-010/012-013* y *KIR3DP1*003/005-06/008/010* se etiquetaron como D (Deleción).

Binomio Donador-Receptor 3



Receptor antes del trasplante

Receptor con TCPH

Donador de CPH

Binomio donador-receptor con genes idénticos.

Figura 14. Genotipificación de KIR. Geles de agarosa al 2% con productos de PCR correspondientes a genes *KIR* obtenidos por la Técnica de PCR-SSP, donde cada pozo o grupo de ellos describen un gen; mientras el control interno de 800pb o 200pb y control negativo indican que la reacción se realizó correctamente. Pozos que presenten una banda con el peso determinado se tomaron como positivas y se establecieron como negativas aquellas en donde únicamente el control interno está presente. Específicamente los pozos 12-13 determinan las variantes de *KIR2DS4*; mientras 20-21 los alelos de *KIR3DP1*; de los cuales el grupo de alelos *KIR2DS4*001/011/014-015* o *KIR3DP1*001-002/004/007/009* que codifican el gen completo están identificados como F (Full); mientras el grupo de alelos que presentan la delección de 22pb dentro de su secuencia *KIR2DS4*003-004/006-010/012-013* y *KIR3DP1*003/005-06/008/010* se etiquetaron como D (Delecion).

De acuerdo con el genotipo KIR del receptor después del trasplante, cuatro diferentes patrones con los que se evaluó el quimerismo se describen en la **Tabla 43**: (1) los genotipos del donador y receptor son iguales [**Id.**: contenido de genes *KIR* idéntico entre hermanos]; (2) los genotipos del donador y receptor son diferentes pero el genotipo del donador está presente en el receptor postrasplante [**Qt**: el receptor trasplantado contiene los genes *KIR* de su donador]; (3) los genotipos del donador y receptor son diferentes pero el genotipo del receptor trasplantado es una mezcla de su genotipo previo al trasplante y de su donador [**Qp**: el receptor trasplantado contiene genes *KIR* propios y de su donador]; (4) los genotipos del donador y receptor son diferentes pero el genotipo del receptor con trasplante es idéntico al que mostraba en la etapa del pretrasplante [**P=Po**: el receptor trasplantado contiene genes *KIR* propios].

Cuando se analizaron las frecuencias para cada uno de estos patrones, se encontró que en el 45.9% de los receptores con TCPH no fue posible evaluar el quimerismo haciendo uso únicamente del contenido de genes *KIR*, pero tras evaluar el polimorfismo alélico de *KIR2DS4* y *KIR3DP1* este porcentaje disminuyó a un 32.4%. De igual forma, en los receptores trasplantados que aparentemente presentaron una quimera total (40.5% vs 45.9%) y en aquellos con una quimera parcial (5.4% vs 13.5%), se observó que la frecuencia para cada uno incrementó después de estudiar estos marcadores; ya que la identificación de los polimorfismos permitió caracterizar con mayor seguridad el tipo de quimerismo presente en cada paciente con TCPH (**Tabla 43**).

Tabla 43. Determinación del quimerismo genético en pacientes con TCPH mediante la tipificación de genes y alelos KIR.

Genotipo			Tipo de quimerismo						
Pre-TCPH	Post-TCPH	Donador	Usando genes KIR	(%) n=37	Usando alelos de KIR2DS4 y KIR3DP1	(%) n=37			
AA1	AA1	AA1	Id.	45.9	Id.	32.4			
AA1	AA1	AA1							
AA1	AA1	AA1							
AA1	AA1	AA1							
Bx2	Bx2	Bx2							
Bx2	Bx2	Bx2							
Bx2	Bx2	Bx2							
Bx2	Bx2	Bx2							
Bx3	Bx3	Bx3							
Bx3	Bx3	Bx3							
Bx5	Bx5	Bx5							
Bx8	Bx8	Bx8							
AA1	AA1	AA1							
AA1	AA1	AA1							
AA1	AA1	AA1	Qt.	40.5	2DS4	F/F	F/D	F/D	45.9
Bx3	Bx3	Bx3			2DS4	D/D	F/D	F/D	
Bx74	Bx74	Bx74			3DP1	D/D	F/D	F/D	
AA1	Bx3	Bx3			2DS4	F/D	D	D	
Bx3	Bx2	Bx2			3DP1	D/D	F/D	F/D	
Bx3	Bx76	Bx76			2DS4	F/D	F	F	
Bx6	Bx7	Bx7			3DP1	D/D	F/D	F/D	
AA1	Bx7	Bx7			3DP1	F/D	D/D	D/D	
Bx2	AA1	AA1			2DS4	F	D	D	
Bx2	AA1	AA1			3DP1	F/D	D/D	D/D	
Bx3	Bx4	Bx4			Idénticos				
Bx4	Bx5	Bx5			Idénticos				
Bx5	Bx28	Bx28			Idénticos				
Bx2	Bx69	Bx69			Idénticos				
Bx2	Bx69	Bx69	Idénticos						
AA1	Bx4	Bx4	Qp.	5.4	2DS4	F/D	F/D	F	13.5
AA1	Bx8	Bx8			3DP1	D/D	F/D	F/D	
Bx7	Bx4	Bx4			2DS4	F/D	F/D	D	
AA1	Bx7	Bx70			3DP1	D/D	F/D	F/D	
Bx2	Bx6	Bx5	2DS4	F	D/D	D/D	P=Po	8.2	
Bx4	Bx4	Bx5	3DP1	F/D	F/D	D			
Bx6	Bx6	Bx70	Idénticos						
Bx7	Bx7	Bx6	P=Po			Idénticos			8.2

Id.: Receptor y donador con genes y alelos KIR idénticos, **Qt.:** Receptor postrasplante que presenta contenido de genes y/o alelos KIR idénticos al donador, **Qp.:** Receptor que posterior a un TCPH presenta una combinación del contenido genético (genes o alelos de KIR) previo al trasplante y del donador, **P=Po:** Receptor con TCPH que presenta el contenido genético previo al trasplante; **F (Full):** Grupo de alelos que codifican el gen completo de *KIR2DS4*001/011/014-015* o *KIR3DP1*001-002/004/007/009*, **D (Delecion):** Grupo de alelos que presentan una delección de 22pb en su secuencia *KIR2DS4*003-004/006-010/012-13* y *KIR3DP1*003/005-006/008/010*, **F/F o D/D:** Genotipo con dos alelos pertenecientes al mismo grupo alélico de KIR2DS4 o KIR3DP1, **F/D:** Genotipo con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico de KIR2DS4 o KIR3DP1.

Columna en negro: Genotipo con base en el grupo alélico de KIR2DS4 o KIR3DP1 encontrado durante la etapa previa al trasplante, **Columna en gris:** Genotipo con base en el grupo alélico de KIR2DS4 o KIR3DP1 encontrado en los donadores; **Columna central:** Genotipo con base en el grupo alélico de KIR2DS4 o KIR3DP1 obtenido después del trasplante proveniente del donador (en gris) o del paciente antes de recibir el trasplante (en negro).

X. DISCUSIÓN

El TCPH se utiliza actualmente en el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas. Sin embargo, sus complicaciones incluyendo la aparición de la EICH todavía limitan la eficacia de este procedimiento (Powles, 2000). Esta enfermedad es una causa importante de morbilidad y mortalidad después de un trasplante alogénico, cuyo padecimiento agudo está en gran medida influido por diferencias en los antígenos de histocompatibilidad (moléculas HLA y mHags) entre el donador y el receptor (Gallardo, 2001). Además de los genes polimórficos que codifican para estos antígenos, es probable que otros genes reguladores de la respuesta inmune desempeñen un papel importante en el resultado del TCPH; ya que la EICH crónica o un rechazo pueden ocurrir aún en los injertos compatibles (Ruggeri, 2002).

Diferentes modelos preclínicos han demostrado que el resultado de un TCPH alogénico se deriva de un delicado equilibrio entre las células T y NK del binomio donador-receptor; ya que estas células son capaces de mediar efectos tanto perjudiciales como benéficos en función de su origen, genotipo y estado de activación (Shlomchik, 1999; Ruggeri, 2002). De esta manera las células NK pueden determinar el resultado del injerto después de un TCPH, mediante la generación del efecto de injerto contra leucemia (GvL) o siendo activos participantes en la EICH (Frag, 2002; Bishara, 2004).

La función de las células NK está regulada por diferentes tipos de receptores, que en la mayoría de los casos interactúan con moléculas HLA de clase I para proteger a las células sanas de la lisis por células NK autólogas y mediar la lisis de aquellas cuya expresión de estas moléculas se ha visto comprometida (Colonna, 2000; Moretta, 2000). Entre estos receptores se encuentra la familia de moléculas tipo inmunoglobulina conocidas como *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors* o receptores KIR (Boyington, 2000; Brooks, 2000), codificados por 15 genes localizados en el cromosoma "19q13.4" (Martin, 2000; Wilson, 2000; Trowsdale, 2001), cuyos transcritos se han detectado tanto en células NK como en algunas células T de memoria CD8⁺ (Mingari, 1996).

La diversidad de los receptores KIR es conferida por la variabilidad en el número y tipo de genes presentes en cada individuo (Rajalingam, 2001), además de su expresión compleja sobre las células NK; ya que pueden expresar diversos miembros de esta familia y la variación observada en el repertorio de estos receptores no solo es determinada por los haplotipos HLA del hospedero (Valiante, 1997; Witt, 1999). Así mismo al igual que sus ligandos, los genes *KIR* son altamente polimórficos y las variaciones en su secuencia parecen estar concentradas en residuos que tienen un impacto sobre su unión a la estructura de las moléculas HLA de clase I; además que el reconocimiento de estas moléculas por los receptores KIR es degenerado, pues el receptor NK interactúa con productos de múltiples alelos HLA de clase I (Trowsdale, 2001; Toneva, 2001).

En este contexto, diferencias a nivel de genes altamente polimórficos como KIR entre el binomio donador-receptor HLA idéntico participante de un TCPH, podrían estar asociadas con la modulación del desarrollo y la severidad de la EICH. Por tal motivo, se analizaron los genes *KIR* de 37 receptores de CPH y sus donadores relacionados HLA idénticos mediante la PCR-SSP para investigar si las diferencias entre éstos tienen un impacto en el resultado del trasplante o desarrollo de EICH.

El análisis de la distribución de genes *KIR* en los 37 binomios reveló que los genes marco o estructurales *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* y el pseudogen *KIR3DP1*, estuvieron presentes en el 100% de los donadores y receptores durante ambas etapas del TCPH, como se ha descrito anteriormente en población Caucásica, Africana y Asiática (Niokou, 2003; Norman, 2002; Yawata, 2002). De igual forma, las frecuencias de los genes y genotipos KIR observados en la población control no difirieron sustancialmente de la frecuencia informada anteriormente en otras poblaciones (Toneva, 2001; Norman, 2001; Gutiérrez-Rodríguez, 2006).

Entre los pacientes diagnosticados con leucemia y el grupo control se observaron diferencias en las frecuencias de los genes *KIR2DL5A*, *2DS1*, *2DS5* y *3DS1* que fueron significativamente mayores en los pacientes leucémicos y sus donadores en contraste con

los controles ($p < 0.05$). Estas frecuencias están probablemente relacionadas con la alta prevalencia del haplotipo telomérico BT7 en los pacientes diagnosticados con leucemia y sus donadores. Esto puede indicar que los genes *KIR2DL5A*, *2DS1*, *2DS5* y *3DS1* están implicados con el padecimiento de leucemia en nuestra población; pues particularmente se ha demostrado que la citotoxicidad de las células NK en la SP de pacientes con leucemia se reduce significativamente (Costello, 2002; Fauriat, 2007). Varios mecanismos podrían ser responsables de esta reducción de la citotoxicidad, principalmente una pérdida de la expresión de ligandos para receptores KIR activadores en blastos leucémicos, pues se ha informado que aunque la célula NK expresa sobre su superficie un fenotipo capaz de activarla, ésta no puede reconocer y destruir a la célula tumoral debido a que ha perdido la expresión de las moléculas HLA de clase I (Brouwer, 2002; Demanet, 2004) o tal vez por la expresión reducida de receptores participantes en la activación de las células NK de pacientes con leucemia (Nowbakht, 2005), pues los clones NK de estos pacientes tienen una función citolítica disminuida debido a que no pueden adquirir un repertorio KIR adecuado que le permita activarse y destruir las células leucémicas (Chiorean, 2003).

Aunque únicamente se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) para los genes *2DL5B* y *2DS3*, la frecuencia de los genes *KIR2DL2*, *2DL5B*, *2DS2* y *2DS3* incrementó en los donadores en comparación con los pacientes leucémicos, lo cual se ve reflejado en la prevalencia de los haplotipos centroméricos BC1 y BC2. Esto puede ser indicativo de que dichos genes podrían estar involucrados con el hecho de que los donadores no desarrollen leucemia aún debido a la predisposición genética que estos tienen por estar directamente relacionados con los pacientes que padecen dicha enfermedad dentro de esta población de estudio, pues se ha informado que las interacciones entre los receptores KIR inhibidores de las células NK y sus ligandos HLA de clase I parecen estar implicados críticamente en el proceso de inmunovigilancia, donde un incremento de la expresión de ligandos HLA de clase I sobre los blastos leucémicos para receptores inhibidores hacen una interacción más eficiente entre las células NK y los blastos leucémicos que permite su eliminación eficaz (Szczepanski, 2010). Además varios estudios sugieren una interacción menos

eficiente entre las células NK y los blastos de LLA, en comparación con la interacción de estas células y los blastos de LMA en el momento del diagnóstico (Ruggeri, 2008), mostrando que la densidad de las moléculas HLA de clase I sobre la superficie parece ser más alta en los blastos de LLA en comparación con los de LMA (Pende, 2005).

Por otro lado, la frecuencia del gen *KIR2DS3* fue significativamente más alta en pacientes con EICHc tras comparar las frecuencias antes y después del trasplante ($p < 0.05$), lo cual indica que un incremento de su frecuencia después del trasplante podría favorecer el desarrollo de EICHc tras recibir un TCPH alogénico HLA idéntico, pues se ha reportado que la fuerza de las interacciones KIR-HLA tiene un valor funcional importante y puede influir en la susceptibilidad a la enfermedad (Winter, 1998).

Investigaciones sobre la funcionalidad de estos receptores describen que los receptores *KIR2DL3* y *2DS3* comúnmente se expresan sobre la misma célula y están funcionalmente vinculados como receptores antagonistas pero la interacción entre *KIR2DL3/HLA-C1* aparentemente confiere una respuesta inhibitoria débil (Ahlenstiel, 2008), mientras *KIR2DS3* se une fuertemente a las moléculas HLA-C1 (Stewart, 2005), por lo que la interacción más débil proveniente del receptor inhibitorio puede ser anulada a través de las señales de receptores activadores unidos a su ligando apropiado provocando la lisis de células blanco (Kulkarni, 2008), lo cual puede provocar el padecimiento de la EICH.

Con basado en la variación del contenido genético determinada por la presencia o ausencia de genes *KIR* específicos, 12 genotipos diferentes se identificaron en todos los individuos que conformaron los 37 binomios. Dependiendo del genotipo, el número de genes *KIR* presentes varió de 7 a 14 genes más dos pseudogenes; encontrándose estos resultados de acuerdo con los datos reportados previamente (Hsu, 2002b; Carrington, 2006).

Los genotipos del grupo B compuestos por un número variable de genes *KIR* se encontraron presentes con mayor frecuencia dentro de nuestra población en

comparación con el genotipo del grupo A, como se ha descrito en otras poblaciones (Gendzekhadze, 2009). Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para ningún genotipo, se puede observar que las frecuencias de los genotipos del grupo B presentan una tendencia a incrementar en los pacientes que desarrollaron EICH, lo cual podría indicar que la obtención de un genotipo conteniendo un mayor número de genes *KIR* codificantes para receptores de tipo activador podría influir en el desarrollo de la enfermedad; mientras la obtención tras el trasplante de un genotipo del grupo A conteniendo únicamente el gen *KIR2DS4* podría proteger de esta enfermedad, pues ciertas investigaciones han concluido que los trasplantes de donadores con haplotipo del grupo B pueden proveer un mayor riesgo para padecer la EICH debido a que tienen más genes *KIR* activadores (Bao, 2010).

La aloreactión de las células NK puede ser pronosticada por la expresión clonal de los receptores KIR sobre su superficie y la presencia o ausencia de sus ligandos en la célula blanco, habiéndose descrito varios mecanismos que podrían explicar el incremento de la citotoxicidad en las células NK; como son: la pérdida de los ligandos para receptores inhibidores que expresan comúnmente su receptor antagonista activador sobre la misma célula (Martin, 2002); la posibilidad de que las señales de inhibición provenientes de los receptores que se aparean con su ligando no influyan sobre las señales de activación, ya que una elevada expresión de moléculas activadoras ofrece una contribución adicional dando una respuesta más vigorosa (Nelson, 2004) o debido a que un receptor KIR en el donador no pueda ser inhibido por un ligando del receptor haciendo que los KIR activadores solo adicionen activación a la célula NK (Leung, 2004).

En lo que respecta al análisis de los haplotipos en la porción centromérica y telomérica, cuatro diferentes haplotipos para cada una de ellas se obtuvieron en todos los individuos que conformaron los 37 binomios donador-receptor. En todos los casos los haplotipos más frecuentes fueron AC1 en la porción del centrómero y AT1 en la porción del telómero como se ha descrito con anterioridad (Rajalingam, 2012; Hou, 2012).

Un nuevo haplotipo no descrito en estudios precedentes (Rajalingam, 2012, Hou, 2012) fue identificado en nuestra población de estudio con una frecuencia del 1.3%, el cual presenta la inserción del gen *KIR2DS3* o *KIR2DS5* en la porción telomérica del complejo KIR. Del mismo modo otro haplotipo recientemente descrito por Rajalingam. R (2012) fue encontrado en nuestra población de estudio con una frecuencia del 2.7%, este se define por la delección del gen *KIR2DL1* y del pseudogen *KIR2DP1* en la región centromérica; mientras el resto de los haplotipos se han descrito en investigaciones anteriores que involucran caucásicos, ingleses, griegos y australianos (Niokou, 2003; Norman, 2001; Witt, 1999).

Por otro lado, las frecuencias de los alelos correspondientes a *KIR2DS4* y *KIR3DP1* que portan la secuencia completa del gen (*KIR2DS4*001/011/014-015* o *KIR*001-002/004/007/009*) y la delección de 22pb (*KIR2DS4*003-004/006-010/012-013* o *KIR3DP1*003/005-006/008/010*) no presentaron diferencias estadísticas. Tras analizar las frecuencias de los genotipos elaborados con base en los grupos alélicos de *KIR2DS4* y *KIR3DP1*, se observó una diferencia estadística ($p < 0.05$) en el genotipo x/D que porta un solo alelo del gen *KIR2DS4* con la delección de 22pb (*KIR2DS4*003-004/006-010/012-013*) y en el genotipo F/D con de dos alelos del pseudogen *KIR3DP1* pertenecientes a diferente grupo alélico (*KIR3DP1*001-002/004/007/009* – *KIR3DP1*003/005-006/008/010*) dentro del grupo de pacientes con EICHc; cuyo incremento después del trasplante puede promover el desarrollo de dicho padecimiento debido a la falta de actividad del receptor *KIR2DS4* cuando presenta la delección (Rajalingam, 2012) y por alelos de *KIR3DP1* asociados fuertemente con regulación génica y la duplicación de genes (Gómez-Lozano, 2005; Vanin, 1980).

El locus *KIR2DS4* es el gen *KIR* activador más polimórfico exhibiendo 13 variantes proteicas, de las cuales nueve (*KIR2DS4*003*, **004*, **006*, **007*, **008*, **009*, **010*, **012* y **013*) presentan una delección de 22 pb en su exón 5, que desplaza el marco de lectura y resulta en un codón de paro prematuro que produce una versión trunca de *KIR2DS4* carente de la región transmembranal, dominios intracitoplasmáticos y tallo de anclaje que

le permita a la proteína mantenerse en la membrana, causando que este único receptor activador no se exprese sobre la superficie celular y pueda ser secretado como un KIR soluble (Hsu, 2002b; Maxwell, 2002).

Ciertos estudios sugieren que KIR2DS4 está presente principalmente sobre haplotipos del grupo A siendo infrecuente en aquellos del grupo B (Maxwell, 2002) y se ha demostrado que sólo una minoría de individuos lo expresan sobre la membrana de sus células NK actuando como un receptor activador potencial, pues aproximadamente el 75% de los haplotipos del grupo A pierde ésta habilidad por acarrear dicha delección (Hsu, 2002b), lo cual provoca que individuos con dicho haplotipo acarreando el alelo con delección para KIR2DS4 no expresen ningún receptor de activación; eliminando así su actividad citolítica (Du, 2007).

Aunque el pseudogen KIR3DP1 esta normalmente silenciado en cuanto a transcripción y traducción, se ha encontrado que ciertos alelos llevan una secuencia promotora que les permite transcribirse (Gómez-Lozano, 2005), estos alelos pueden restringir la expresión génica al ocupar la maquinaria de transcripción en sus transcritos que no serán útiles o regular la expresión de un gen funcional cuando su transcrito se produce en sentido opuesto al gen, formando heterodúplex no funcionales de ARN gen-pseudogen (Vanin, 1980). Además este pseudogen se ha asociado fuertemente con la duplicación de los genes KIR3DP1, KIR2DL4 y KIR3DL1/KIR3DS1 generada por recombinación a través de un crossing-over desigual con KIR2DL5A, lo que incrementa el número de genes inhibidores sobre un haplotipo existiendo la posibilidad de incrementar la respuesta inhibitoria en los diversos clones de células NK (Gómez-Lozano, 2005).

Por otro lado, se ha descrito que el alelo KIR3DP1 * 004, tiene la capacidad de transcribirse y traducirse a una proteína trunca, la cual ha perdido los exones que codifican el tallo, la región transmembranal e intracitoplasmática originando que el producto se secrete como receptor soluble al medio extracelular, eliminando su capacidad para funcionar como un receptor de membrana (Gómez-Lozano, 2005). Tal receptor secretado

podría tener un efecto parácrino sobre las células que expresan sus ligandos o competir con la función de los receptores de membrana que tienen un conjunto de ligandos superpuestos sobre la misma célula (Borges, 1997).

Después de un TCPH alogénicas, las células progenitoras del donador colonizan el sistema hematopoyético del paciente, pero además de estas células el inóculo trasplantado contiene células sanguíneas maduras del donador incluyendo células NK, células dendríticas (DCs) y células T; cuyas interacciones pueden conducir a diferentes resultados dependiendo de la circunstancia, funcionando como un punto de control que determina si una respuesta inmune innata (células NK) o adaptativa (células T) es promovida (Grau, 2004).

Aun cuando el donador y el receptor son HLA idénticos, la EICH ocurre frecuentemente en los pacientes trasplantados, esta enfermedad es causada por células T aloreactivas maduras en el injerto, que atacan tejidos del receptor que han sido estresados por el régimen de acondicionamiento mieloablativo; especialmente aquellos tejidos que normalmente tienen un alto grado de división celular como la piel, hígado, intestino y pulmón. Esto activa la respuesta al estrés y una tormenta de secreción de citocinas. Las células T CD4⁺ aloreactivas del donador originan una respuesta a moléculas MHC de clase II alogénicas expresadas sobre CDs del receptor y maduran para convertirse a células TH1 CD4⁺ efectoras, que en combinación con las CDs, activan a las células CD8⁺ aloreactivas para convertirlas a linfocitos T citotóxicos CD8⁺ efectores. Estos linfocitos interrumpen la actividad de las citocinas e inflamación en los tejidos, donde exacerban el daño al matar las células del hospedero y alterar aún más el tejido. El estrés resultante del régimen de acondicionamiento en tejidos de proliferación activa, combinado con el ataque de estos tejidos por las células T aloreactivas derivadas del donador causan la EICH (Ruggeri, 2002).

Poco después de un TCPH, las células NK son la primera población de linfocitos que aparecen en SP y el repertorio de receptores KIR en estas células reconstituidas son consistentemente del donador (Shilling, 2002). Las células NK derivadas del donador pueden

ser aloreactivas si sus KIR inhibidores no ven un ligando HLA de clase I relevante que estaba presente en el donador. Estas células NK aloreactivas previenen la aparición de la EICH mediante la muerte de las células dendríticas del receptor que son necesarias para la activación de las células T aloreactivas que causan la EICH (Shlomchik, 1999; Ruggeri, 2002)

Por lo tanto, en situación de trasplante, cuando el donador posee un haplotipo KIR del grupo A portando el receptor activador KIR2DS4 con delección, las células NK del donador que reconstituyeron el sistema hematopoyético del paciente, no expresan ningún receptor que le permita establecer su actividad citolítica; tal como sucede cuando el donador porta una copia de la secuencia completa del pseudogen KIR3DP1 dentro de su haplotipo, ya que estos alelos podrían restringir o regular la expresión de genes activadores funcionales o duplicar genes inhibidores dentro del mismo haplotipo, incrementando el número de receptores inhibidores expresados sobre la membrana de las células NK, lo que aumenta la respuesta inhibitoria de estos clones NK; originando en ambos casos que las células NK no puedan ocasionar la muerte de las CD del hospedero que promueven la activación de células T aloreactivas del donador causando la EICH

Por otra parte, realizar el análisis del quimerismo es esencial en el seguimiento de pacientes sometidos a un trasplante alogénico de CPH; ya que el estado de quimera es uno de los factores principales que determina el curso del trasplante. Para caracterizar el quimerismo en un paciente con TCPH, es necesario conocer el patrón genético de sus células sanguíneas después de haber recibido el trasplante mediante la detección del origen de dichas células, a través del análisis molecular de una serie de marcadores genéticos polimórficos del ADN (Lion, 2001).

Con el análisis molecular del polimorfismo de los genes *KIR* en muestras de SP del binomio donador-receptor durante ambas etapas del trasplante, fue posible establecer el origen de las células sanguíneas en los pacientes trasplantados. La comparación del patrón genético de KIR en los pacientes trasplantados con el portado previo al trasplante y el de

su respectivo donador, permitió establecer diferentes patrones para evaluar el quimerismo en nuestra población de estudio. Fueron cuatro los patrones descritos (todos idénticos, quimera parcial, quimera total y pre/postrasplante idénticos) en los pacientes trasplantados para establecer su estado de quimerismo, encontrando que el 40.5% presentaron quimerismo total, demostrando un patrón de injerto sostenido por una recuperación completa del sistema inmune a partir de los progenitores hematopoyéticos del donador, un 5.4% desarrollaron quimerismo parcial presentando un patrón predecible de rechazo del injerto y el 8.2% de los pacientes trasplantados presentaron un patrón idéntico al del pretrasplante mostrando un patrón de probable recaída a la enfermedad.

En el 45.9% de los receptores con TCPH no fue posible establecer el origen de dichas células haciendo uso exclusivo del contenido de genes *KIR* que conformaron el genotipo de los binomios, debido a que su contenido genético antes del trasplante es idéntico al de su donador; siendo necesario el uso de polimorfismos genéticos para establecer concretamente el tipo de quimerismo establecido después del trasplante para evaluar el resultado del mismo. Por lo tanto, tras evaluar el polimorfismo a nivel alélico de *KIR2DS4* y *KIR3DP1* el porcentaje de este grupo disminuyó a un 32.4%; mientras en los grupos de quimerismo total y quimerismo parcial, se observó que la frecuencia para cada uno incrementó después de tipificar los alelos de estos genes *KIR*. Así, el patrón de quimerismo para cada una de las muestras puede establecerse con mayor exactitud tras tipificar a nivel alélico un mayor número de genes *KIR*.

Finalmente, el objetivo de caracterizar el quimerismo utilizando el polimorfismo de los genes *KIR* es dar un seguimiento a los pacientes con un TCPH; para establecer el comportamiento del injerto y detectar tempranamente la posibilidad de rechazo o recaída que pueda ayudar a la administración oportuna de inmunoterapia adicional; ya que su estado de quimerismo permite determina el curso del trasplante.

XI. CONCLUSIONES

La EICH ocurre frecuentemente en los pacientes trasplantados, aun cuando el donador y receptor son HLA idénticos debido a la participación de otros genes involucrados en la respuesta inmune. La tipificación de los genes *KIR* y sus variantes alélicas (*KIR2DS4* y *KIR3DP1*) mediante la técnica de PCR-SSP, permitió establecer la participación de estos genes en el desarrollo de la EICH y determinar el origen de las células hematopoyéticas del paciente trasplantado para darle seguimiento al trasplante.

Los genes *KIR2DL5A*, *2DS1*, *2DS5* y *3DS1* pertenecientes al haplotipo telomérico BT7, están asociados con el padecimiento de leucemia, tras comparar las variaciones observadas entre pacientes diagnosticados con leucemia o sus donadores y el grupo control.

Los genes *KIR2DL5B* y *2DS3* pertenecientes al haplotipo centromérico BC2 podrían conferir protección a los donadores para que no desarrollen leucemia, incluso con la predisposición genética que tienen por estar directamente relacionados con los pacientes que padecen leucemia.

El gen *KIR2DS3* contribuye al desarrollo de EICHc en pacientes que han recibido un TCPH alogénico HLA idéntico.

Se identificaron 12 genotipos diferentes, en los cuales no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), pero los genotipos del grupo B fueron los más frecuentes.

Se encontró un nuevo haplotipo dentro de nuestra población, el cual presenta la inserción del gen *KIR2DS3* o *KIR2DS5* en la porción telomérica del complejo *KIR*, además de otro recientemente descrito que refiere la delección del gen *KIR2DL1* y del pseudogen *KIR2DP1* en la región centromérica.

El injerto proveniente de un donador con genotipo x/D hemicigoto para KIR2DS4 portador de alguna variante con delección (*KIR2DS4*003-004/006-010/012-013*), al igual aquel de un donador acarreado el genotipo F/D heterocigoto para KIR3DP1 con dos alelos pertenecientes a diferente grupo alélico (*KIR*001-002/004/007/009 - KIR*003/005-006/008/010*), es capaz de promover el desarrollo de EICHc en los receptores del TCPH.

El análisis molecular de zonas altamente polimórficas en el ADN como los genes *KIR*, permitió establecer patrones genéticos que determinan la evolución de la quimera en los pacientes sometidos a un TCPH; para poder relacionar el estado de quimerismo con el comportamiento del injerto o el padecimiento de EICH, posibilitando la detección precoz de rechazo o recaída en los pacientes trasplantados y la administración oportuna de inmunoterapia adicional.

El polimorfismo de los genes *KIR* constituye otro parámetro importante que debe ser tomado en cuenta para la selección adecuada de los donadores de CPH y pueden ser marcadores útiles para determinar el curso del trasplante (comportamiento del injerto, rechazo o recaída) y administración de inmunoterapia adicional de forma oportuna.

XII. LIMITACIONES

Aunque nuestra población de estudio no fue suficiente y una muestra mayor hubiera requerido mayor tiempo y costo, ésta ha dado resultados que muestran la participación del polimorfismo de KIR en el desarrollo de la EICH.

XIII. PERSPECTIVAS

Con base en estos resultados es posible direccionar nuevos estudios para esclarecer la participación del polimorfismo de KIR en el resultado del TCPH y el padecimiento de EICH; siendo necesarios estudios de expresión y regulación génica en las células NK para establecer de forma concreta su participación; ya que los diferentes haplotipos de KIR pueden ser ampliamente diversificados por el elevado polimorfismo alélico de dichos genes, generando diversos repertorios KIR sobre las células NK que podrían influir en la fuerza total de activación e inhibición, originando resistencia o la susceptibilidad a la EICH.

Estos nuevos hallazgos podrían ser útiles para el desarrollo de nuevas estrategias de inmunoterapia a base de células NK durante un TCPH.

XIV. RESUMEN DE RESULTADOS

Cuadro 5. Asociación del polimorfismo de genes *KIR* con la Enfermedad de Injerto contra Hospedero.

Rasgo genético	OR (IC95%)	p	Característica
<i>Genes KIR2DL5A, KIR2DS1, KIR2DS5, KIR3DS1</i>	Haplotipo BT7	2.3 (1.3-4.0)	Riesgo a padecer Leucemia.
	porción telomérica.	1.9 (1.1-3.5)	
		1.9 (1.1-3.4)	
		1.9 (1.1-3.5)	
<i>Genes KIR2DL2, KIR2DS2</i>	Haplotipo BC2	Tendencia a incrementar	Protección a padecer Leucemia (Donadores).
	porción centromérica.	en donadores	
<i>Genes KIR2DL5B, KIR2DS3</i>	Haplotipo BC4	0.4 (0.2-0.8)	
	porción centromérica.	0.5 (0.3-0.9)	
<i>Gen KIR2DS3</i>		2.5 (1.4-4.8)	Riesgo a desarrollar EICH crónica.
<i>KIR2DS4*003/004/006/007/008/009/010/012/013</i>	Genotipo x/D hemicigoto para <i>KIR2DS4</i>	3.9 (1.8-8.4)	Riesgo a desarrollar EICH crónica.
<i>KIR3DP1*003/005/006/008/010 KIR3DP1*001/002/004/007/009</i>	Genotipo F/D heterocigoto para <i>KIR3DP1</i>	2.0 (1.1-3.7)	Riesgo a desarrollar EICH crónica.
<i>Genes KIR3DL3, 2DS2, 2DL2, 2DL5B, 2DS5, 3DP1, 2DL4, 3DS1, 2DL5A, 2DS5, 2DS1, 3DL2</i>	Delección de <i>KIR2DP1</i> y <i>2DS1</i>		Nuevo haplotipo en porción centromérica
<i>Genes KIR3DL3, 2DL3, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DS1, 2DL5A, 2DS3, 2DS5, 2DS1, 3DL2</i>	Inserción de <i>KIR2DS3</i> o <i>2DS5</i>		Nuevo haplotipo en porción telomérica
Polimorfismo de genes <i>KIR</i> .	Evaluación de Quimerismo pos-TCPH.		
	Marcadores para determinar curso del TCPH.		
	Parámetro de selección del donador de CPH.		

XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahlenstiel G, Martin MP, Gao X, Carrington M, Rehermann B. Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J Clin Invest* 2008 Mar;118(3):1017-26.
2. Akpek G, Lee SJ, Flowers ME, Pavletic SZ, Arora M, Lee S, et al. Performance of a new clinical grading system for chronic graft-versus-host disease: a multicenter study. *Blood* 2003 Aug;102(3):802-9.
3. Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, Graw RG, Levine AS, Deisseroth AB. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978 Jul;52(1):85-95.
4. Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, Van Bekkum DW, Gluckman E, Good RA, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1990 Jun 15;75(12):2459-64.
5. Auletta JJ, Cooke KR. Bone marrow transplantation: new approaches to immunosuppression and management of acute graft-versus-host disease. *Curr Opin Pediatr* 2009 Feb;21(1):30-8.
6. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968 Dec 28;2(7583):1364-6.
7. Bandini G, Bonifazi F, Baccharani M. 15 or 33 years of cord-blood transplantation? *Lancet* 2003 May 3;361(9368):1566-7.
8. Bao XJ, Hou LH, Sun AN, Qiu QC, Yuan XN, Chen MH, et al. The impact of KIR2DS4 alleles and the expression of KIR in the development of acute GVHD after unrelated allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2010 Sep;45(9):1435-41.
9. Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(5):257-60.
10. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003 Oct;48(1):35-43.
11. Baron F, Little MT, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood Rev* 2005 May;19(3):153-64.
12. Baron F, Sandmaier BM. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* 2006 Oct;20(10):1690-700.
13. Behar E, Chao NJ, Hiraki DD, Krishnaswamy S, Brown BW, Zehnder JL, et al. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1996 Feb 1;334(5):286-91.
14. Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, et al. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 1996 Feb 1;183(2):645-50.

15. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 2001 Jun;14(6):661-4.
16. Bishara A, De SD, Witt CC, Brautbar C, Christiansen FT, Or R, et al. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens* 2004 Mar;63(3):204-11.
17. Borges L, Hsu ML, Fanger N, Kubin M, Cosman D. A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* 1997 Dec 1;159(11):5192-6.
18. Boyington JC, Motyka SA, Schuck P, Brooks AG, Sun PD. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 2000 Jun 1;405(6786):537-43.
19. Brouwer RE, van der HP, Schreuder GM, Mulder A, Datema G, Anholts JD, et al. Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon. *Hum Immunol* 2002 Mar;63(3):200-10.
20. Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol* 2008 Jun;127(3):286-97.
21. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro RC, Graves V, Yoder M, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 May 1;89(9):4109-13.
22. Canobbio MM. Mosby's. Handbook of Patient Teaching. Ed. ELSERVIER. United States of America. 2006. 498-504.
23. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 2005 Oct 15;175(8):5222-9.
24. Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:225-57.
25. Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE, et al. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 2003 Jan 20;197(2):245-55.
26. Chiorean EG, Dylla SJ, Olsen K, Lenvik T, Soignier Y, Miller JS. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). *Blood* 2003 May 1;101(9):3527-33.
27. Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Dec 15;90(24):12000-4.
28. Colonna M. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity* 2009 Jul 17;31(1):15-23.
29. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 2003 May;3(5):413-25.

30. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2010 Oct 7;116(14):2411-9.
31. Cooley S, Xiao F, Pitt M, Gleason M, McCullar V, Bergemann TL, et al. A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood* 2007 Jul 15;110(2):578-86.
32. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 2004 Jan;25(1):47-52.
33. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001 May 15;97(10):3146-51.
34. Cortes J. *Chronic Myeloid Leukemia*. Ed. Springer. United States of America. 2006. 18-26.
35. Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer* 2004 Nov 1;101(9):1936-46.
36. Cutler C, Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem Cells* 2001;19(2):108-17.
37. DAUSSET J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 1958 Jul;20(1-4):156-66.
38. De KJ, Van Bekkum DW, Dicke KA, Dooren LJ, Radl J, van Rood JJ. Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969 Jun 21;1(7608):1223-7.
39. Demanet C, Mulder A, Deneys V, Worsham MJ, Maes P, Claas FH, et al. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood* 2004 Apr 15;103(8):3122-30.
40. Diaconescu R, Flowers CR, Storer B, Sorrow ML, Maris MB, Maloney DG, et al. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared with myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors. *Blood* 2004 Sep 1;104(5):1550-8.
41. Dohring C, Samaridis J, Colonna M. Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. *Immunogenetics* 1996;44(3):227-30.
42. Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 2007 Jan;59(1):1-15.
43. Eaves CJ. *Anatomy and physiology of Hematopoiesis*. Ed. Cambridge University Press. United States of America. 2006. 276-90.
44. Faguet GB. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. Ed. Humana Press. New Jersey. 2004. 57-76.
45. Fan QR, Mosyak L, Winter CC, Wagtmann N, Long EO, Wiley DC. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature* 1997 Sep 4;389(6646):96-100.

46. Farag SS, Fehniger T, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cells: biology and application in stem-cell transplantation. *Cytotherapy* 2002;4(5):445-6.
47. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002 Sep 15;100(6):1935-47.
48. Faure M, Long EO. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 2002 Jun 15;168(12):6208-14.
49. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003 Apr 15;101(8):3052-7.
50. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009 May 2;373(9674):1550-61.
51. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol* 2006 Jan;43(1):3-10.
52. Ford CE, HAMERTON JL, BARNES DW, LOUITT JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 1956 Mar 10;177(4506):452-4.
53. Garcia CA, Robinson J, Guethlein LA, Parham P, Madrigal JA, Marsh SG. Human KIR sequences 2003. *Immunogenetics* 2003 Jul;55(4):227-39.
54. Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, Pando M, Carr WH, Rajalingam R, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol* 2001 Mar 1;166(5):2992-3001.
55. Gendzekhadze K, Norman PJ, bi-Rached L, Graef T, Moesta AK, Layrisse Z, et al. Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Nov 3;106(44):18692-7.
56. Giralto S, Estey E, Albitar M, van BK, Rondon G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997 Jun 15;89(12):4531-6.
57. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997 Aug 7;337(6):373-81.
58. Gómez-Lozano N, Estefania E, Williams F, Halfpenny I, Middleton D, Solis R, et al. The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR2DL4 and KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated. *Eur J Immunol* 2005 Jan;35(1):16-24.
59. GOODMAN JW, HODGSON GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962 Jun;19:702-14.
60. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1996 Feb 1;334(5):281-5.

61. Graef T, Moesta AK, Norman PJ, bi-Rached L, Vago L, Older Aguilar AM, et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med* 2009 Oct 26;206(11):2557-72.
62. Grau R, Lang KS, Wernet D, Lang P, Niethammer D, Pusch CM, et al. Cytotoxic activity of natural killer cells lacking killer-inhibitory receptors for self-HLA class I molecules against autologous hematopoietic stem cells in healthy individuals. *Exp Mol Pathol* 2004 Apr;76(2):90-8.
63. Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med* 1995 Mar 1;181(3):1133-44.
64. Gutierrez-Rodriguez ME, Sandoval-Ramirez L, az-Flores M, Marsh SG, Valladares-Salgado A, Madrigal JA, et al. KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico. *Hum Immunol* 2006 Jan;67(1-2):85-93.
65. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Aldemir H, et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol* 2004 Jun;34(6):1673-9.
66. Hansen JA, Petersdorf E, Martin PJ, Anasetti C. Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors. *Immunol Rev* 1997 Jun;157:141-51.
67. Hernández EG. Genotipo de KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Receptor) en lesiones asociadas a *Helicobacter pylori* en población mestiza mexicana. UNAM. 2008. 33-35.
68. Herzig RH, Bortin MM, Barrett AJ, Blume KG, Gluckman E, Horowitz MM, et al. Bone-marrow transplantation in high-risk acute lymphoblastic leukaemia in first and second remission. *Lancet* 1987 Apr 4;1(8536):786-9.
69. Hillard LM. Adult Acute Lymphocytic Leukemia. Ed. Humana Press. New York. 2010. 25-44.
70. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002 Dec;190:40-52.
71. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002 Nov 1;169(9):5118-29.
72. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001 Oct;31(10):3121-7.
73. Jaffe ES. Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Ed. World Health Organization Classification. United States of America. 2001. 198-200.
74. Karp JE. Acute Myelogenous Leukemia. Ed. Humana Press. New Jersey. 2007. 373-84.
75. Khakoo SI, Geller R, Shin S, Jenkins JA, Parham P. The D0 domain of KIR3D acts as a major histocompatibility complex class I binding enhancer. *J Exp Med* 2002 Oct 7;196(7):911-21.
76. Kikuchi-Maki A, Yusa S, Catina TL, Campbell KS. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol* 2003 Oct 1;171(7):3415-25.

77. Kim DH, Park JY, Sohn SK, Lee NY, Suh JS, Lee KB. The association between multidrug resistance-1 gene polymorphisms and outcomes of allogeneic HLA-identical stem cell transplantation. *Haematologica* 2006 Jun;91(6):848-51.
78. Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells* 1999;17(5):286-94.
79. Korbling M, Burke P, Braine H, Elfenbein G, Santos G, Kaizer H. Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1981 Jul;9(6):684-90.
80. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 2008 Dec;20(6):343-52.
81. KURNICK NB, MONTANO A, GERDES JC, FEDER BH. Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. *Ann Intern Med* 1958 Nov;49(5):973-86.
82. Lanier LL. DAP10- and DAP12- associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 2009 Jan;227(1):150-60.
83. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003 Jun;15(3):308-14.
84. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-93.
85. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-74.
86. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008 May;9(5):495-502.
87. Laskaris GP. *Atlas of Oral Diseases*. Ed. Thieme. New York. 2006. 184-85.
88. Lee SH, Miyagi T, Biron CA. Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol* 2007 Jun;28(6):252-9.
89. Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 1997 Jun;6(6):655-61.
90. Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* 2004 Jan 1;172(1):644-50.
91. Lion T. Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical-biological situations. *Leukemia* 2001 Feb;15(2):292.
92. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990 Jul;11(7):237-44.
93. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de WT, Dini G, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant* 2010 Feb;45(2):219-34.

94. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007 Aug;13(8):965-74.
95. Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S, et al. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* 1997 Feb;155:135-44.
96. LORENZ E, UPHOFF D, REID TR, SHELTON E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951 Aug;12(1):197-201.
97. MAIN JM, PREHN RT. Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 1955 Feb;15(4):1023-9.
98. Malmberg KJ, Bryceson YT, Carlsten M, Andersson S, Bjorklund A, Bjorkstrom NK, et al. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008 Oct;57(10):1541-52.
99. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* 2010 Jun;63(6):434-44.
100. Mandelboim O, Reyburn HT, Vales-Gomez M, Pazmany L, Colonna M, Borsellino G, et al. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 1996 Sep 1;184(3):913-22.
101. Markey KA, MacDonald KP, Hill GR. Impact of cytokine gene polymorphisms on graft-vs-host disease. *Tissue Antigens* 2008 Dec;72(6):507-16.
102. Marsh SG. Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2011. *Tissue Antigens* 2011 Jul;78(1):77-9.
103. Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* 2000 Apr;51(4-5):268-80.
104. Martin AM, Kulski JK, Gaudieri S, Witt CS, Freitas EM, Trowsdale J, et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* 2004 Jun 23;335:121-31.
105. Martin MP, Bashirova A, Traherne J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J Immunol* 2003 Sep 1;171(5):2192-5.
106. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002 Aug;31(4):429-34.
107. Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, Wade J, et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002 Sep 15;169(6):2818-22.

108. Martin PJ, Weisdorf D, Przepiorka D, Hirschfeld S, Farrell A, Rizzo JD, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: VI. Design of Clinical Trials Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006 May;12(5):491-505.
109. Mattson MR. Graft-versus-host disease: review and nursing implications. *Clin J Oncol Nurs* 2007 Jun;11(3):325-8.
110. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens* 2002 Sep;60(3):254-8.
111. McGOVERN JJ, Jr., RUSSELL PS, ATKINS L, WEBSTER EW. Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N Engl J Med* 1959 Apr 2;260(14):675-83.
112. McQueen KL, Parham P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol* 2002 Oct;14(5):615-21.
113. Messina C, Faraci M, de F, V, Dini G, Calo MP, Calore E. Prevention and treatment of acute GvHD. *Bone Marrow Transplant* 2008 Jun;41 Suppl 2:S65-S70.
114. Middleton D, Meenagh A, Gourraud PA. KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics* 2007 Feb;59(2):145-58.
115. MIESHCER P, FAUCONNET M. [Evidence of different leukocytic groups in man]. *Schweiz Med Wochenschr* 1954 May 22;84(21):597-9.
116. Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 2008 Mar 15;180(6):3969-79.
117. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002 Sep;2(9):656-63.
118. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 1995 Sep 1;182(3):875-84.
119. Moscardo F, Sanz GF, Sanz MA. Unrelated-donor cord blood transplantation for adult hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2004 Jan;45(1):11-8.
120. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 2004 Oct 1;173(7):4273-6.
121. Norman PJ, bi-Rached L, Gendzekhadze K, Hammond JA, Moesta AK, Sharma D, et al. Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes. *Genome Res* 2009 May;19(5):757-69.
122. Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics* 2001;52(3-4):195-205.

123. Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, Kalberer CP, Rossy E, Mori L, et al. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* 2005 May 1;105(9):3615-22.
124. Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow, case report. *Ann Intern Med* 1939 Sep;13(2):357-67.
125. Pavletic SZ, Smith LM, Bishop MR, Lynch JC, Tarantolo SR, Vose JM, et al. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem-cell transplantation. *Am J Hematol* 2005 Apr;78(4):265-74.
126. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* 2005 Mar 1;105(5):2066-73.
127. Perez-Simon JA, Caballero D, ez-Campelo M, Lopez-Perez R, Mateos G, Canizo C, et al. Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia* 2002 Aug;16(8):1423-31.
128. Perez-Simon JA, ez-Campelo M, Martino R, Brunet S, Urbano A, Caballero MD, et al. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2005 Aug;130(3):394-403.
129. Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca I, ez-Campelo M, Caballero D, San MJ. Chronic graft-versus-host disease: Pathogenesis and clinical management. *Drugs* 2006;66(8):1041-57.
130. Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, ste-Amezaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 1998 Dec 1;161(11):5821-4.
131. Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, et al. The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 2001 Mar;112(4):988-94.
132. Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guegan JF, Guernier V, Balloux F. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr Biol* 2005 Jun 7;15(11):1022-7.
133. Pyo CW, Guethlein LA, Vu Q, Wang R, bi-Rached L, Norman PJ, et al. Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. *PLoS One* 2010;5(12):e15115.
134. Rajalingam R, Gardiner CM, Canavez F, Vilches C, Parham P. Identification of seventeen novel KIR variants: fourteen of them from two non-Caucasian donors. *Tissue Antigens* 2001 Jan;57(1):22-31.
135. Rajalingam R. Overview of the killer cell immunoglobulin-like receptor system. *Methods Mol Biol* 2012;882:391-414.
136. Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, Fu J, Uberti JP. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant* 2001 Jul;28(2):121-9.
137. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001;19:291-330.

138. Remberger M, Mattsson J, Hentschke P, Aschan J, Barkholt L, Svennilson J, et al. The graft-versus-leukaemia effect in haematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2002 Dec;30(11):761-8.
139. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001 May 15;97(10):2962-71.
140. Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2008 Jan;41(2):207-14.
141. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002 Mar 15;295(5562):2097-100.
142. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Capanni M, Carotti A, Aloisi T, et al. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008 Jan;40(1):84-90.
143. Russell NH, Gratwohl A, Schmitz N. Developments in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Br J Haematol* 1998 Dec;103(3):594-600.
144. Salim PH, Jobim M, Jobim LF, Xavier RM. Autoimmune rheumatic diseases and their association with killer immunoglobulin-like receptor genes. *Rev Bras Reumatol* 2011 Jul;51(4):351-4.
145. Santos GW, Sensenbrenner LL, Burke PJ, Mullins GM, Anderson PN, Tutschka PJ, et al. Allogeneic marrow grafts in man using cyclophosphamide. *Transplant Proc* 1974 Dec;6(4):345-8.
146. Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, et al. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol* 2002 Oct 15;169(8):4253-61.
147. Savani BN, Mielke S, Adams S, Uribe M, Rezvani K, Yong AS, et al. Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007 Oct;21(10):2145-52.
148. Scheinberg DA. *Treatment of Leukemia and Lymphoma*. Ed. ELSEVIER Academic Press. United States of America. 2004. 185-187, 319-20.
149. Schetelig J, Kiani A, Schmitz M, Ehninger G, Bornhauser M. T cell-mediated graft-versus-leukemia reactions after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother* 2005 Nov;54(11):1043-58.
150. Schonberg K, Sribar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 2011 Jan 6;117(1):98-107.
151. Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens* 1996 Oct;48(4 Pt 1):285-94.

- 152.Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunol Rev* 1997 Feb;155:183-96.
- 153.Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D, et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol* 2002 Mar 1;168(5):2307-15.
- 154.Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 2002 Jul 1;169(1):239-47.
- 155.Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999 Jul 16;285(5426):412-5.
- 156.Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S, Leavesley D. Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymphoma* 1994 Feb;12(5-6):353-63.
- 157.Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002 Nov;2(11):850-61.
- 158.Speck B, Zwaan FE, van Rood JJ, EERNISSE JG. Allogeneic bone marrow transplantation in a patient with aplastic anemia using a phenotypically HLA-identical unrelated donor. *Transplantation* 1973 Jul;16(1):24-8.
- 159.Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vely F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 13;102(37):13224-9.
- 160.Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vely F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 13;102(37):13224-9.
- 161.Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boyiadzis M. Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer Immunol Immunother* 2010 Jan;59(1):73-9.
- 162.Tanaka N. Experimental studies on role of spleen in recovery from radiation injury in mice. I. Effect of splenectomy on survival of mice following x-irradiation. *Hiroshima J Med Sci* 1966 Dec;15(4):309-23.
- 163.Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N, Yawata M, et al. Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol* 2007 Jan 1;178(1):33-7.
- 164.Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977 Apr;49(4):511-33.
- 165.Thomas ED, LOCHTE HL, Jr., LU WC, FERREBEE JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957 Sep 12;257(11):491-6.
- 166.Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* 1975 Apr 24;292(17):895-902.

167. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol* 1999 Oct;36(4 Suppl 7):95-103.
168. Thomas ED. Transplantation of hematopoietic progenitor cells with emphasis on the results in children. *Turk J Pediatr* 1995 Jan;37(1):31-43.
169. Toneva M, Lepage V, Lafay G, Dulphy N, Busson M, Lester S, et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens* 2001 Apr;57(4):358-62.
170. Torkar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol* 1998 Dec;28(12):3959-67.
171. Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol* 2008 Jun;21(2):101-17.
172. Trompeter HI, Gomez-Lozano N, Santourlidis S, Eisermann B, Wernet P, Vilches C, et al. Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *J Immunol* 2005 Apr 1;174(7):4135-43.
173. Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity* 2001 Sep;15(3):363-74.
174. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997 Dec;7(6):753-63.
175. Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 2002 Jul;54(4):221-9.
176. Urbano-Ispizua A. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: stem cell source. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007 Jun;20(2):265-80.
177. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997 Dec;7(6):739-51.
178. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997 Dec;7(6):739-51.
179. van Rood JJ, EERNISSE JG, van LA. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 1958 Jun 21;181(4625):1735-6.
180. Vilches C, Pando MJ, Parham P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* 2000 Jul;51(8-9):639-46.
181. Vilches C, Rajalingam R, Uhrberg M, Gardiner CM, Young NT, Parham P. KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. *J Immunol* 2000 Jun 1;164(11):5797-804.

182. Vilches C, Gardiner CM, Parham P. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. *J Immunol* 2000 Dec 1;165(11):6416-21.
183. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:217-51.
184. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011 Jan 7;331(6013):44-9.
185. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, et al. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 1995 May;2(5):439-49.
186. Waters TM, Bennett CL, Pajean TS, Sobocinski KA, Klein JP, Rowlings PA, et al. Economic analyses of bone marrow and blood stem cell transplantation for leukemias and lymphoma: what do we know? *Bone Marrow Transplant* 1998 Apr;21(7):641-50.
187. Williams F, Maxwell LD, Halfpenny IA, Meenagh A, Sleator C, Curran MD, et al. Multiple copies of KIR 3DL/S1 and KIR 2DL4 genes identified in a number of individuals. *Hum Immunol* 2003 Jul;64(7):729-32.
188. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Apr 25;97(9):4778-83.
189. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998 Jul 15;161(2):571-7.
190. Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol* 1997 May 1;158(9):4026-8.
191. Yawata M, Yawata N, bi-Rached L, Parham P. Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit Rev Immunol* 2002;22(5-6):463-82.
192. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006 Mar 20;203(3):633-45.

<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/> (2012).

<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index3.htm> (2012).