



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS c.214A>G Y c.-181+3191T>C DEL
RECEPTOR NKG2D EN LEUCEMIAS AGUDAS.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARTÍNEZ MAGAÑA JOSÉ JAIME

DIRECTOR: DRA MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

ASESOR: DRA RAQUEL RETANA UGALDE



MÉXICO D.F a 29 de JUNIO de 2015



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



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de histocompatibilidad de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI bajo la dirección de la **Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez**.

El siguiente trabajo recibió los siguientes apoyos financieros:
FIS/IMSS/PROT/G14/1322 y FIS/IMSS/PROT/MD14/1350.

Se agradece también al **Dip. Fernando Zarate Salgado**, por su apoyo para la impresión de esta tesis.

DEDICATORIAS.

Primeramente quiero agradecer a mis padres, **Jaime Martínez Chávez** y **María Guadalupe Magaña García**, así como a mis hermanos, **Jorge Armando Martínez Magaña** y **Humberto Alonso Martínez Magaña**, los cuales son los actores de mi formación académica, pero principalmente formaron a la persona que soy ahora, con todos sus defectos y virtudes. Quiero agradecerles por todo el apoyo, los regaños, las jaladas de orejas, las horas eternas para poder terminar mis tareas, los momentos divertidos que hemos pasado juntos, pero principalmente porque sé que siempre estarán ahí para cuando los necesite.

En segundo lugar quisiera agradecer a la **Dra. Alma Delia Denis Mendoza**, por todo su apoyo, aún cuando a veces le he sacado canas verdes.

También quisiera agradecer a **Luis Solis Minero**, **Irene Medina Robles**, **Luis Antonio Solis Medina** y **Laura Lizbett Solis Medina**, por toda su paciencia y apoyo, en verdad muchas gracias por toda, toda, toda su ayuda.

Por último, pero no por eso menos importante, quisiera agradecer a **Anayelly Solis Medina**, por todo las aventuras que hemos pasado juntos, por todas las barreras que hemos tenido que saltar juntos, por todas las decisiones que me has ayudado a tomar, por tu apoyo cuando he sentido que flaqueo y no sé qué hacer. Pero principalmente quiero agradecerte porque me has brindado tu corazón, y espero en verdad poder seguir muchos años más juntos. Gracias mi chaparrita, muchas gracias.

Esta tesis está dedicada a todos ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	23
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
RESULTADOS.....	30
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	35
CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS.....	38
ANEXOS.....	50

I. RESUMEN

ANTECEDENTES: Las células NK se encargan de matar células que se encuentran bajo estrés, como son las células que se encuentran infectadas por virus o tumorales. Para que la célula NK pueda reconocer a las células blanco, esta célula utiliza un conjunto de receptores de membrana, conocidos como receptores de células NK (NKR's). Los NKR's al entrar en contacto con la célula blanco envían señales al interior de la célula NK para activar o inhibir mecanismos de citotoxicidad, donde estos mecanismos de citotoxicidad conllevaran a la muerte de la célula blanco. La activación de los mecanismos de citotoxicidad no solo se realiza por efecto de un receptor, si no por el balance de las señales de los NKR's. Por lo que una modificación estructural en un NKR podría conllevar a una actividad citotóxica deficiente de la célula NK. Todas las modificaciones que podrían sufrir los NKR's se encuentran codificados a nivel de la secuencia de DNA que codifica para los NKR's. Una modificación ampliamente estudiada a nivel de la secuencia de DNA, en todo el genoma no solo en las secuencias que codifican para los NKR's, son los polimorfismos de un solo nucleótido (del inglés single nucleotide polymorphism SNP's). En el caso del receptor NKG2D, existe evidencia donde se han asociado polimorfismos con algunas patologías como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, hepatitis crónica y carcinoma cervical.

OBJETIVO: Establecer si existe asociación genética entre los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C del receptor NKG2D en pacientes con LMA y LLA dentro de una población mexicana.

MÉTODO: Se realizó un estudio de genotipificación de SNP's basado en casos y controles; para buscar asociación entre los polimorfismos y el desarrollo de Leucemias agudas.

RESULTADOS: Se encontró asociación entre el desarrollo de leucemia mieloblástica aguda y el polimorfismo c.-181+3191T>C.

CONCLUSIONES: El polimorfismo c.-181+3191T>C puede ser un marcador para el desarrollo de leucemia mieloblástica aguda.

II. ABREVIATURAS.

NK: Asesinas naturales del inglés “Natural killer”

NKR: Receptores de células asesinas naturales

KIR: Receptores de células asesinas parecidos a inmunoglobulinas

NCR: Receptores citotóxicos naturales

A: Adenina

G: Guanina

C: Citocina

T: Timina

NKG2D: Receptor de tipo de D de células asesinas naturales.

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda.

LMA: Leucemia Mieloblástica Aguda.

LD: Desequilibrio de ligamiento.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.

III. INTRODUCCIÓN.

Las células asesinas naturales (células NK) son un tipo de linfocito que se encuentra altamente involucrado en la inmunidad innata. Las células NK se encargan de reconocer células infectadas por virus o que se han transformado en células tumorales, y por mecanismos de citotoxicidad mediada por células matan a células alteradas. La forma en que las NKs reconocen a las células blanco es mediante receptores que se encuentran en la membrana de las célula NK, conocidos como receptores de células NK (NKR's). Los NKR's se agrupan en tres tipos, los receptores de células asesinas parecidos a inmunoglobulinas (KIR, del inglés human killer cell immunoglobulin like receptors), los tipo C - lectina y los receptores citotóxicos naturales (NCR). Estos receptores además de mediar el reconocimiento de las células blanco por la célula NK también regulan la activación e inhibición de la actividad citotóxica de esta célula efectora. El balance entre las señales activadoras e inhibitoras de los NKR's regulan la homeostasia de las células NK. Uno de los receptores ampliamente involucrado en la regulación de la actividad de las células NK, es el receptor NKG2D. El receptor NKG2D es un miembro de los receptores tipo C - lectinas. Existen evidencias que indican que polimorfismos en el receptor NKG2D pueden estar asociados con diversas patologías como es el caso de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, hepatitis crónica y carcinoma cervical. En este trabajo se analizó la asociación entre los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C (NM_001199805.1) del receptor NKG2D en las leucemias agudas.

IV. MARCO TEÓRICO.

IV. 1 Hematopoyesis.

La hematopoyesis (figura 1) es el proceso mediante el cual se generan, regulan, producen y desarrollan las células que circulan en la sangre periférica. [1,2]. Este proceso ocurre en el interior de los huesos, en la médula ósea [3].

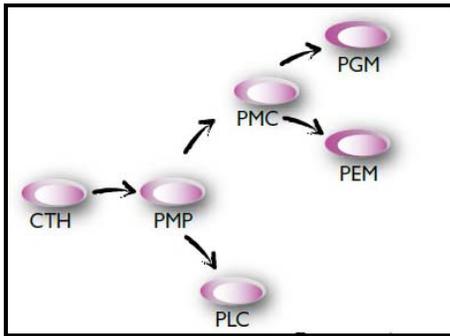


Figura 1.- Primera etapa de la hematopoyesis (tomada y modificada de [3]). La célula troncal hematopoyética (CTH), da lugar a Progenitores Multipotentes (PMP), los cuales pierden la capacidad de autorenovarse pero generan al Progenitor Linfocítico Común (PLC) y al Progenitor Mieloide Común (PMC). El PMC genera Progenitores Granulocítico/Monocíticos (PGM) y a Progenitores Eritroides/Megacariocíticos (PEM), los cuales continúan con su vía de diferenciación, y dan lugar a las células maduras circulantes

Las células de la sangre pueden dividirse en dos grandes grupos: mieloides y linfoides. Dentro de las células mieloides se encuentran los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, eritrocitos y trombocitos. Las células linfoides son los linfocitos B, linfocitos T y células NK. El proceso para generar las células mieloides se conoce como mielopoyesis; mientras que para originar células linfoides se conoce como linfopoyesis [3].

IV. 1.1 Mielopoyesis

Durante la mielopoyesis (figura 2) la célula progenitora granulocítica/monocítica da origen a dos estipes celulares: eritroide – megacariocítica y granulocítica - monocítica. La generación de la estirpe eritroide – megacariocítica se efectúa cuando el progenitor eritroide-megacariocítico (PEM), da lugar a Unidades

Formadoras de Brote Eritroide (BFU-E), quienes originaran Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU-E), para posteriormente diferenciarse a proeritroblastos (PE), eritroblastos basofílicos (EB), eritroblastos policromatófilicos (EPC), eritroblastos ortocromáticos (EO), reticulocitos (RET) y células eritroides maduras. El PEM también puede dar lugar a Células Formadoras de Brotes Megacariocíticos (Meg-BFC), los cuales generan Células Formadoras de Colonias Megacariocíticas (Meg-CFC), que posteriormente generaran megacariocitos inmaduros (Meg-I) y maduros (Meg-M), que liberaran a las plaquetas al torrente sanguíneo. Durante la generación de la estirpe granulocítica – monocítica. Los progenitores gránulo-monocito o Unidades Formadoras de Colonias Gránulo-monocíticas (CFU-GM), originan Unidades Formadoras de colonias Granulocíticas (CFU-G) y Unidades Formadoras de Colonias Mielocíticas (CFU-M). Una vez comenzado el proceso de diferenciación las CFU-G dan lugar a mieloblastos (MIEL), promielocitos (PM), mielocitos (MIEL), metamielocitos (MM) y células maduras (basófilos, neutrófilos y eosinófilos). Mientras que las CFU-M dan lugar a monoblastos (MONOB), promonocitos (PMON), monocitos (MON), y finalmente macrófagos. [3]

IV. 2 Enfermedades hemato – oncológicas.

Las enfermedades hemato – oncológicas son un grupo de neoplasias originadas a partir de alteraciones en el ciclo de vida, del crecimiento, de la diferenciación y de la muerte de las células progenitoras hematopoyéticas. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran cuatro desordenes: las leucemias, el mieloma múltiple, el linfoma no – Hodgkin y la enfermedad de Hodgkin [4].

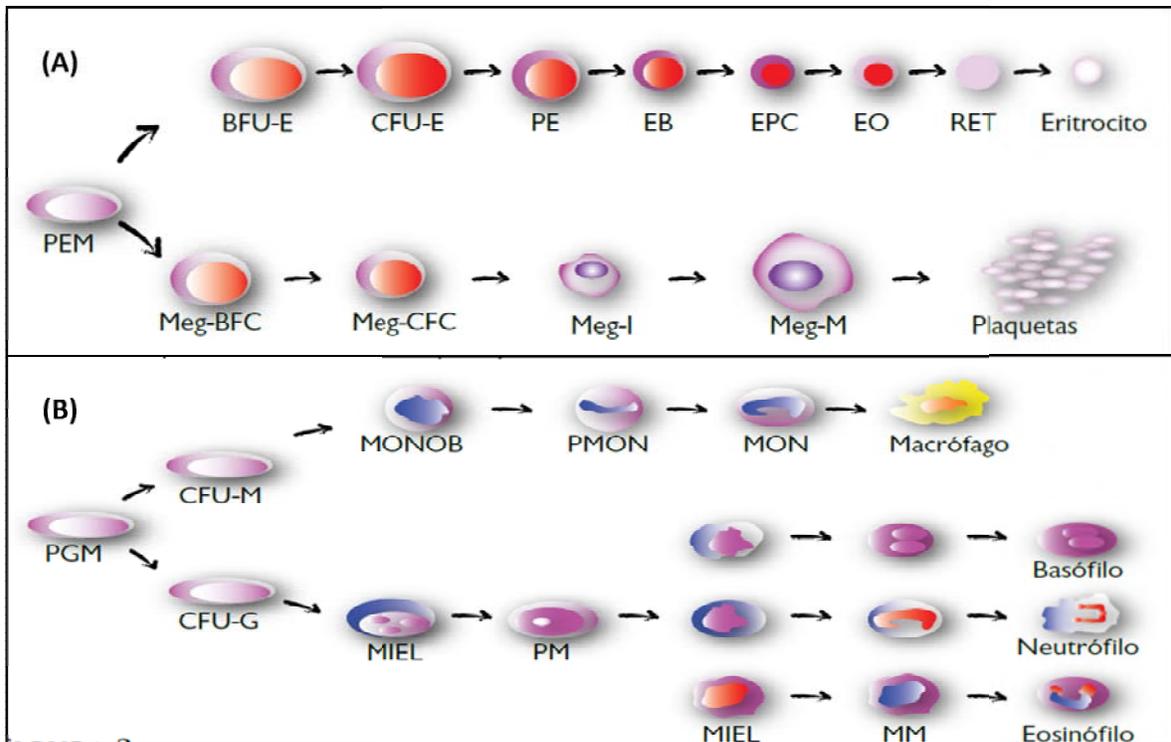


Figura 2.- Mielopoiesis. (A) Generación de la estirpe eritroide – megacariocítica. (B) Generación de la estirpe granulocítica – monocítica.

IV. 3 Leucemias.

Las leucemias se encuentran conformadas por un grupo de enfermedades en las que la manifestación común es una proliferación no regulada y maligna de células endógenas de la médula ósea [5].

Las leucemias se clasifican de acuerdo a dos factores: al linaje hematopoyético y al estadio de maduración de las células afectadas. Así, en las leucemias agudas, por el curso de la enfermedad, se ven afectados los estadios tempranos de maduración, mientras que en leucemias crónicas ocurre lo contrario.

De acuerdo al origen de la célula leucémica se dividen en linfoide o mieloide. Con base a estos dos criterios existen cuatro tipos principales de leucemias: la

leucemia linfoblásticas aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloblástica aguda (LMA) y leucemia mieloide crónica (LMC) [5 - 7]. De estos cuatro tipos se derivan varios subtipos que dependen de aspectos inmunológicos, citogenéticos y morfológicos [6, 7].

IV. 3.1 Leucemias agudas.

Las leucemias agudas son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación progresiva no regulada, y acumulación de precursores hematopoyéticos inmaduros, llamados blastos, en la médula ósea así como en sangre periférica [5, 9].

IV. 3.1.1 Leucemia linfoblástica aguda (LLA).

La LLA es una neoplasia que se caracteriza por la proliferación de células precursoras (linfoblastos) comprometidos con el linaje, ya sea B o T, con afección a médula ósea o sangre periférica [8].

IV. 3.1.2 Leucemia mieloblástica aguda (LMA).

Es un grupo heterogéneo de leucemias que se presentan en precursores de células mieloides, eritroides, megacariocíticos y monocíticos [9].

IV. 4 Células NK (natural killers).

IV. 4. 1 Descripción de las células NK.

Las células NK (del inglés **natural killers**) son linfocitos que median la actividad citotóxica contra células tumorales e infectadas por virus [10 - 12].

Histológicamente tienen la morfología de linfocitos granulares grandes. Representan en el humano del 10 al 15% de los linfocitos de sangre periférica [13, 14]. La actividad de las células NK se descubrió por primera vez en los años 70's, cuando se observó que linfocitos recientemente aislados de huéspedes sin inmunizar podían promover la lisis de líneas celulares tumorales alogénicas [15 - 17]. Estudios subsecuentes demostraron que las células NK eran células que carecían de los antígenos de superficie característicos de los linfocitos B o T, por lo que se les conoció con el nombre de células "nulas" [18, 19].

Recientemente, las células NK se han clasificado oficialmente como miembros prototipo del grupo 1 de células linfoides innatas (ILC's, del inglés innate lymphoid cells), las cuales se definen por su capacidad de secretar IFN- γ pero no citocinas de tipo 2 (IL-4 e IL-13), IL-17 o IL-22 [16, 20, 21]. Inmunofenotípicamente las células NK humanas carecen de la expresión en su superficie del marcador CD3, pero expresan en su superficie los marcadores CD56 y una isoforma de 14kDa de la molécula de adhesión neural (NCAM, del inglés neural cell adhesion molecule). [16, 22]. Existen dos poblaciones de células NK, de acuerdo a la densidad de expresión en la superficie de la célula NK del marcador CD56. La mayoría de las células NK humanas ($\approx 90\%$) tiene una baja densidad de expresión de CD56 (CD56^{dim}) y expresan una alta densidad del receptor Fc γ III (Fc γ RIII, CD16); mientras que $\approx 10\%$ de las células NK expresan alta densidad de CD56 (CD56^{bright}) con baja (CD16^{dim}) o nula densidad de expresión de CD16 (CD16⁻) [23]. Se ha reportado que las células NK CD56^{bright} son la que presentan la mayor actividad citotóxica [24].

IV. 4. 2 Mecanismo de citotoxicidad de las células NK.

La función principal de las células NK, es la de matar células que se encuentran bajo estrés, como pueden ser células infectadas por virus o células tumorales, sin embargo estas células no son su único blanco. Las células infectadas por bacterias intracelulares [25, 26], así como también células dendríticas inmaduras pueden ser blancos de las células NK [27 - 29].

El mecanismo por el cual las células NK matan a las células aberrantes, se conoce como **citotoxicidad mediada por células**. Este mecanismo de citotoxicidad lo utilizan otras células del sistema inmune además de las células NK, como son los linfocitos T citotóxicos (CTL's, del inglés cytotoxic T lymphocytes) [30 - 32].

Las células NK y los CTL's ($CD8^+$) juegan un papel complementario en la respuesta inmunológica. Los CTL's presentan una respuesta específica hacia antígenos y reconocen péptidos derivados de virus o tumores, presentados vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC I) [33, 34].

Sin embargo las células bajo estrés disminuyen la expresión del MHC tipo I, esta subexpresión conlleva a que estas células aberrantes puedan escapar a la muerte mediada por CTL's [35, 36]. Las células NK presentan la particularidad de poder montar mecanismos de citotoxicidad contra células que han disminuido la expresión del MHC de tipo I. Como la célula NK reconoce y mata células con subexpresión del MHC de clase I, a este proceso se le conoce como "teoría de falta de reconocimiento de lo propio" (del inglés "**missing - self recognition**") [37, 38].

Dentro de la célula NK, el organelo efector de la citotoxicidad, son los lisosomas secretores, mejor conocidos con el nombre de **gránulos líticos** [39]. Los gránulos líticos son lisosomas que comparten la función degradativa de los lisosomas convencionales, pero estos gránulos líticos presentan la capacidad de ser excitados de manera regulada [40 - 42]. El principal contenido de los gránulos líticos en las células NK y en los CTL's, son las proteínas con actividad lítica, conocidas como: **granzima y perforina** [43 – 45]. La unión de la célula blanco a la célula NK promueve la exocitosis de los gránulos líticos por la célula NK. Una vez excitados los gránulos líticos liberan su contenido al espacio intercelular. La perforina una vez en el espacio intercelular facilita la entrada de la granzima hacia el citoplasma de la célula blanco. Una vez dentro del citoplasma, la granzima activa muchos blancos intracelulares que promueven la muerte celular, como las caspasas. Las caspasas son mediadores en el proceso de apoptosis celular, con lo que se promueve la muerte de la célula blanco [46, 47]. Para asegurarse que las células NK no maten células indiscriminadamente, la exocitosis de los gránulos líticos es un proceso que se encuentra altamente regulado [39].

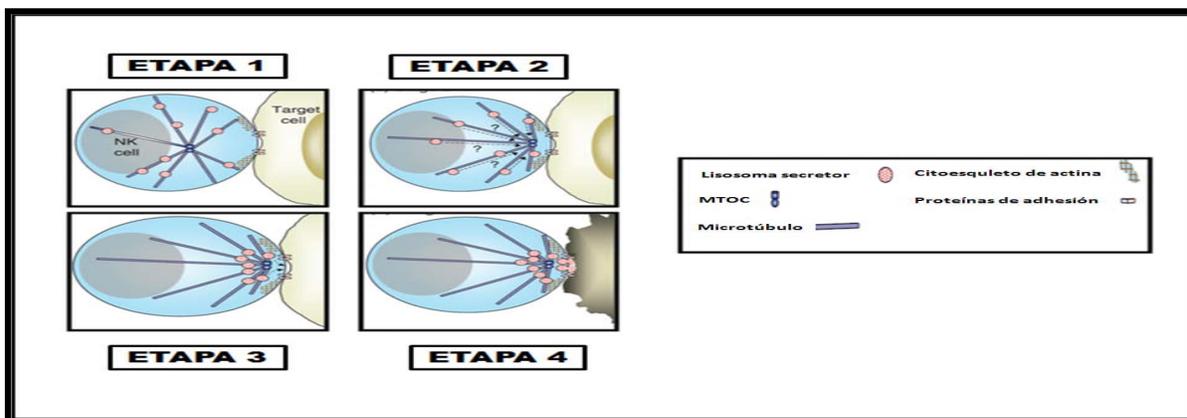


Figura 3.- Etapas de la citotoxicidad mediada por células (tomada y modificada de [39]).

La citotoxicidad mediada por células puede dividirse en cuatro etapas (Figura 3). La primera etapa es la formación de una **sinapsis lítica**, donde la célula NK es activada por la unión con su célula blanco y existe una remodelación del citoesqueleto de la célula NK. Durante la segunda etapa el centro organizador de microtúbulos (MTOC, del inglés microtubule organizing centre) de la célula NK y los gránulos líticos se agrupan cerca de la zona de la sinapsis lítica (unión célula NK – célula blanco). En la tercera y cuarta etapa, los gránulos líticos se unen a la membrana celular de la célula NK y finalmente liberan su contenido citotóxico hacia la sinapsis lítica, promoviendo la muerte de la célula blanco [39].

IV. 4. 3 Receptores de las células NK (NKR´s).

La actividad citotóxica de la célula NK se encuentra altamente regulada por un conjunto de receptores que se encuentran en la membrana citoplasmática de las células NK. Estos receptores regulan principalmente las señales para activar o inhibir la secreción de gránulos líticos por la célula NK [48]. Dentro de los receptores de las células NK (NKR´s) que regulan la actividad citotóxica, se pueden identificar tres tipos principales: a) receptores de células asesinas parecidos a inmunoglobulinas (KIR, del inglés killer immunoglobulin like receptors), b) receptores de citotoxicidad natural (NCR´s, del inglés natural cytotoxicity receptors) y c) los receptores tipo C – lectina [49, 50].

IV. 4. 3. 1 Receptores de células asesinas parecidos a inmunoglobulinas (KIR´s).

Los receptores KIR (también conocidos como CD158), son un conjunto de glicoproteínas transmembranales de tipo I, las cuales tienen de dos a tres dominios parecidos a inmunoglobulina, en la porción extracelular del receptor [51 - 53].

Existen alrededor de 15 genes y 2 pseudogenes que codifican receptores KIR, los cuales se encuentran en una región de 150 kb del cromosoma 19 (19q13.4) [54 - 57]. La región que codifica a los genes KIR es una de las más polimórficas de todo el genoma humano, tanto en cantidad de genes como en la secuencia de estos [58].

Dentro de los receptores KIR, existen dos familias principales, los receptores KIR inhibidores y los activadores. Los receptores KIR inhibidores son aquellos que tienen un dominio citoplasmático muy largo, donde presentan motivos inhibidores basados en tirosina (ITIMs, del inglés immunoreceptor tyrosine based motifs, I/VxYxxL/V), los cuales reclutan fosfatasa de tirosina que activaran cascadas de señales intracelulares para inhibir la citotoxicidad de la célula NK. Por otra parte, la familia de receptores KIR activadores (figura 4), presentan un dominio citoplasmático muy corto, por lo que para realizar su efecto activador deben unirse a una molécula efectora, conocida como DAP - 12 (también llamada KARAP o TYROBP, del inglés killer cell activating receptor - associated protein o tyrosine kinase binding protein) [59]. La molécula adaptadora DAP -12, presenta en su estructura motivos activadores basados en tirosina (ITAMs, del inglés immunoreceptor tyrosine based motifs, Yxx(L/I/V)_{x6-8}Yxx(L/I/V)), los cuales reclutan

cinastas de tirosina, que activaran blancos intracelulares para estimular a la célula NK para secretar sus gránulos líticos(figura 4) [53, 60].

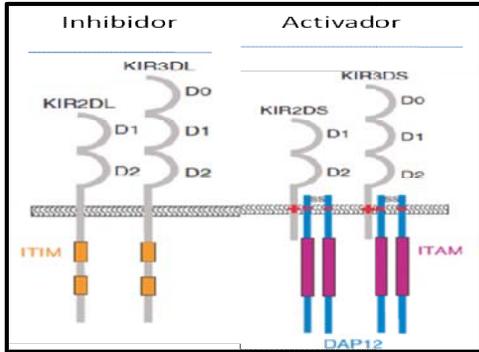


Figura 4.- Principales diferencias estructurales entre los receptores KIR inhibidores e activadores (tomada y modificada de [53]).

Los ligandos principales de los receptores KIR inhibidores son las moléculas del MHC de clase I (HLA – A, HLA – B o HLA – C), las cuales se expresan en casi todas las células normales nucleadas [53]. La unión de las moléculas del MHC de clase I a los receptores KIR inhibidores conlleva a una serie de señales intracelulares que anularan la citotoxicidad de la célula NK montada contra células propias, a este proceso se le conoce como “armado” o “educación” de la célula NK. Por lo que la expresión de los receptores KIR en lo célula NK es primordial para la inhibición de la citotoxicidad de la célula NK en contra de las células propias del organismo [61 – 63].

IV. 4. 3. 2 Receptores de citotoxicidad natural (NCRs).

Las células NK son altamente eficientes en matar células que han disminuido la expresión de moléculas del MHC de clase I, sin embargo las células NK también pueden promover efectos citotóxicos sobre las células que expresan en su superficie moléculas del MHC de clase I. Los NKR´s que regulan el proceso de citotoxicidad de las células NK sin necesidad de moléculas del MHC de clase I, se

conocen como receptores de citotoxicidad natural (NCR's del inglés natural cytotoxicity receptors) [64 - 66]. Los NCR's se descubrieron cuando con anticuerpos monoclonales dirigidos hacia moléculas del MHC de la célula blanco, la célula NK aún podía estimular la citólisis de la célula blanco; suponiéndose así la existencia de receptores que podían activar los mecanismos de citotoxicidad natural de la célula NK, de forma independiente a la unión a moléculas del MHC de clase I [68].

Los NCR's son proteínas transmembranales de tipo I, que a diferencia de las inmunoglobulinas y los receptores de células T (TCR's), no efectúan recombinación somática (rearreglos genéticos V(D)J) para activarse [50].

Mediante clonación se han descubierto tres NCR's, que son: NKp46, NKp30 y NKp44. NKp46 y NKp30 se pueden encontrar expresados de forma constitutiva en la superficie de las células NK, mientras que NKp44 se expresa después de la activación de la célula NK [69, 70]. Existen algunas diferencias estructurales entre los tres receptores (figura 5), NKp46 tiene dos dominios tipo inmunoglobulina en la región extracelular del receptor; mientras que NKp30 y NKp44 solo presenta un dominio tipo inmunoglobulina [50]. La región intracelular de los NCR's es muy corta y carecen de dominios ITAM en su estructura, por lo que necesitan de moléculas adaptadoras para activar la citotoxicidad de la célula NK. NKp44 a diferencia de los otros dos NCR's tiene un dominio ITIM en la región intracelular de este receptor [50].

El receptor NKp46 se encuentra codificado en el gen NCR1 que se encuentra en el cromosoma 19, a diferencia de los receptores NKp30 y NKp44 que se encuentran codificados por los genes NCR2 y NCR3 respectivamente; los cuales se encuentran en el cromosoma 6 [50].

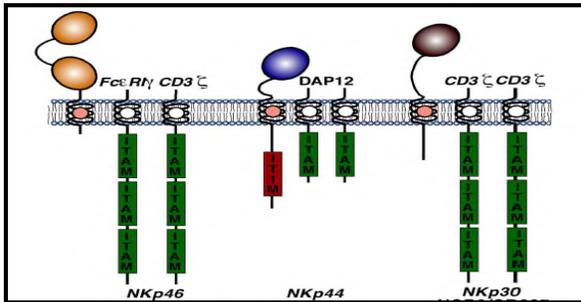


Figura 5.- Estructura de los receptores NCR's; donde se muestran su molécula adaptadora y sus dominios tipo inmunoglobulina, uno para NKp44 y dos para NKp46 y NKp30 (tomada y modificada de [50]).

Los NCR's reconocen ligandos expresados en la superficie de las células que se encuentran bajo estrés, ya sea infectada por virus o células cancerígenas. La unión de los NCR's con su respectivo ligando activa a las moléculas adaptadoras intracelulares. La unión NCR – ligando – molécula adaptadora activa un cascada de señales intracelulares que desencadenan la secreción de gránulos líticos por la célula NK, promoviendo así la muerte de la célula que se encuentra bajo estrés [71].

IV. 4. 3. 3 Receptores tipo C – lectinas.

Los NKR's tipo C – lectinas son un conjunto de proteínas transmembranales de tipo II, que estructuralmente tienen un dominio extracelular de unión a carbohidratos dependiente de iones calcio [72, 73]. En humanos estos receptores se encuentran representados por la familia NKG2, la cual comprende 7 miembros: - A, - B, - C, - D, - E, - F y - H [74, 75].

La familia NKG2 en el humano se encuentra codificada en una región de ≈ 2.5 Mb dentro del cromosoma 12 (12p13.1 – p13.2), conocida como el complejo asesino natural (NKC, del inglés natural killer complex, figura 6) [76]. De los siete miembros de la familia NKG2, los miembros A/B y E/H son variantes alternativas del mismo gen [77, 78]. El miembro que en su secuencia se encuentra menos relacionado con los otros receptores de la familia NKG2, es el receptor NKG2D [74].

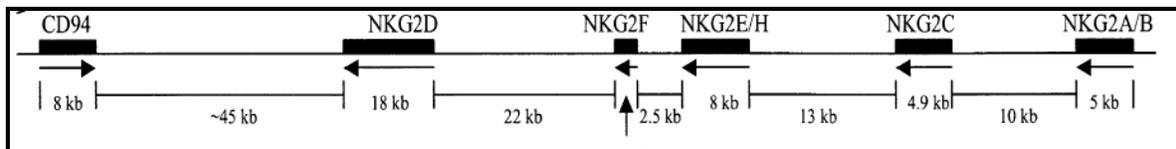


Figura 6.- Estructura del NKC (natural killer complex), donde se encuentran codificados los miembros de la familia de receptores NKG2, las flechas indican el sentido en el que se transcribe el receptor (tomada y modificada de [81]).

Estructuralmente todos los miembros de la familia NKG2, excepto NKG2D, se encuentran como heterodímeros con la molécula CD94 [79, 80]. Los receptores NKG2 A/B presentan en su estructura motivos ITIM. Mientras que los miembros NKG2 E/H y C, se acoplan en el dominio intracelular con la molécula adaptadora DAP – 12, la cual presenta motivos ITAM en su estructura, por lo que estos receptores tiene una función activadora sobre la célula NK [81]. Los ligandos para los miembros de la familia NKG2, excepto el receptor NKG2D, son las moléculas del HLA – E de clase Ib [82].

IV. 4. 3. 3. 1 Receptor NKG2D.

El receptor NKG2D pertenece a la familia de las C – lectinas y se expresa en células NK, así como células T $\gamma\delta$, células T CD8 $\alpha\beta$ y células NKT. Estructuralmente el receptor NKG2D se encuentra en forma de homodímero unido a un homotetrámero con la proteína adaptadora DAP – 10, la cual es la encargada de transmitir la señal intracelular. En los humanos los ligandos del receptor NKG2D son las cadenas relacionadas con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MICA y MICB) y la familia de proteínas de unión a UL – 16 (ULBP 1, ULBP 2, ULBP 3 y ULBP 4 [83]. Bajo condiciones fisiológicas normales la expresión de los ligandos del receptor NKG2D se encuentra restringido al epitelio gastrointestinal, células epiteliales y los fibroblastos [84, 85]. Sin embargo la expresión es inducible al estrés [86] y se encuentra expresado en muchos tumores sólidos y en muchas enfermedades hemato – oncológicas, [87]. Por consecuencia la expresión del receptor NKG2D y sus ligandos, juegan un papel crucial en los mecanismos montados por la célula NK contra las células tumorales.

Deficiencias en la expresión y en la secuencia aminoacídica del receptor NKG2D y sus ligandos se han asociado al desarrollo de diferentes patologías oncológicas. Las modificaciones en la expresión y en la estructura aminoacídica son consecuencia de modificaciones a nivel de la secuencias nucleotídica que codifica el receptor NKG2D y sus ligandos. Una posible manera de entender como el receptor NKG2D se encuentra asociado al desarrollo de algunas patologías es mediante al estudio de las modificaciones nucleotídicas que pueda presentar el

receptor NKG2D. Una de las variaciones a nivel genético más utilizadas para su asociación con patologías son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Los SNP son cambios de un nucleótido que se presentan en más del 1% de la población. Los SNP's pueden provocar cambios a nivel de la secuencia aminoacídica de una proteína, modificar los niveles de expresión o simplemente no provocar ningún cambio fisiológico.

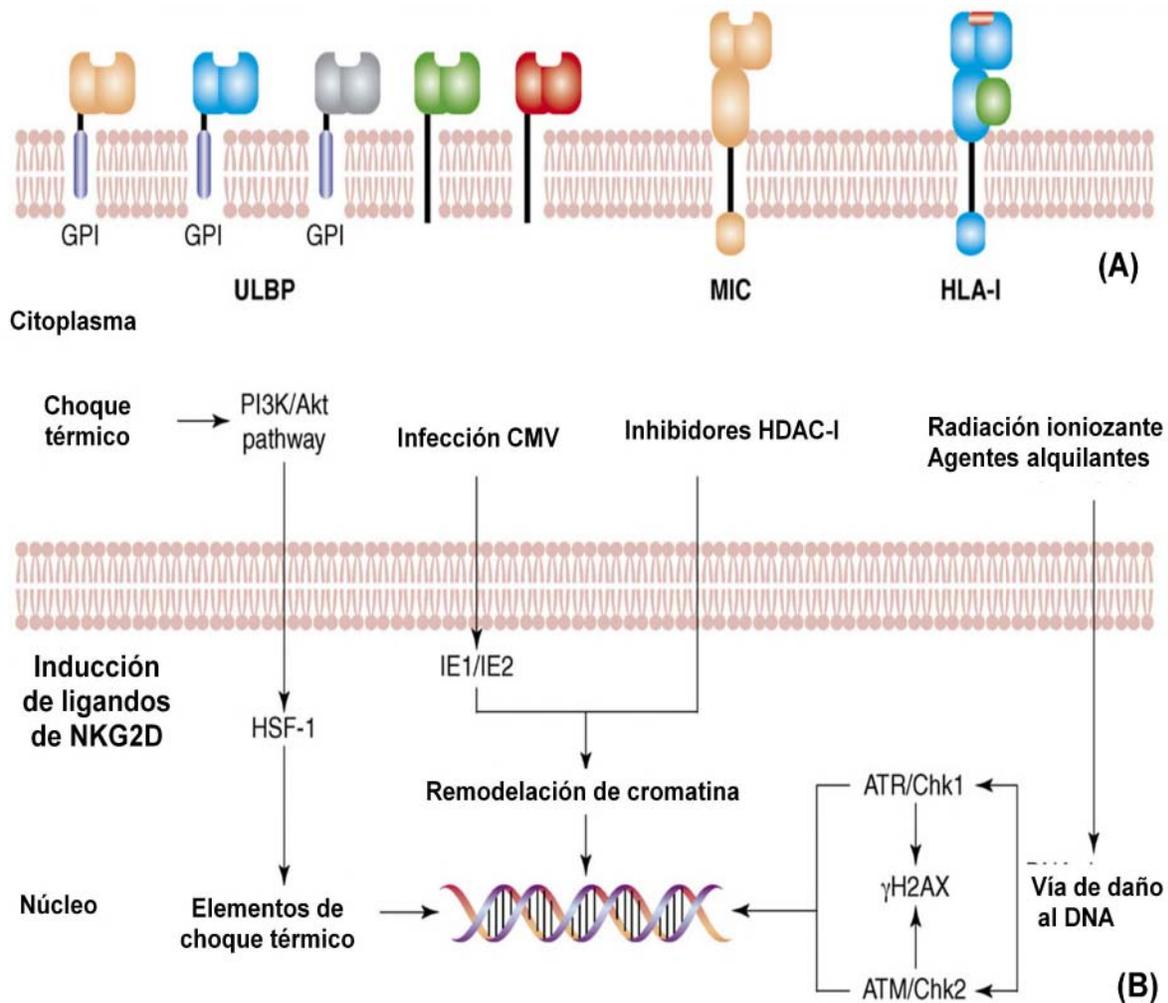


Figura 7.- Ligandos del Receptor NKG2D. (A) Estructura de los ligandos de NKG2D. (B) Mecanismos de inducción de la expresión de los ligandos de NKG2D. (Tomada y modificada de [86]).

Existen muchos estudios donde se han asociado algunos SNP's en los ligandos del receptor NKG2D y en el propio receptor NKG2D con algunas patologías, como artritis reumatoide, carcinoma cervical y algunas enfermedades hemato – oncológicas. Además de que algunos SNP's se han asociado con una disminución en la actividad citotóxica de la célula NK. Pero no se ha realizado ningún estudio de asociación con el receptor NKG2D en leucemias agudas, por lo que realizar estudios en este receptor y sus ligandos nos ayudarían a comprender mejor el mecanismo de desarrollo de las leucemias agudas.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Según el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas [88], las leucemias representan el 5.42% del total de neoplasias en México, siendo la mortalidad por leucemia linfoide y mieloide del 4.6% del total de defunciones registradas. La alta tasa de mortalidad provocada por las leucemias se debe a la gran resistencia que existe de las células leucémicas. Existen muchos mecanismos en los cuales radica la resistencia de las células leucémicas, uno de estos mecanismos es la evasión de inmunovigilancia montada por el sistema inmune contra estas células. Una de las células involucradas en la inmunovigilancia contra el cáncer son las células NK, las cuales mediante mecanismos de citotoxicidad promueven la muerte de las células tumorales. Los mecanismos de citotoxicidad de estas células, se encuentran regulados por receptores de membrana activadores e inhibidores. Por lo que, indagar en los cambios genéticos de estos receptores de las células NK puede llevarnos a comprender mejor la forma en que las células leucémicas evaden los mecanismos del sistema inmune, montados contra ellas y así poder generar marcadores pronósticos para las leucemias. De ahí se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existirá asociación entre los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C de NKG2D y el desarrollo de LMA y LLA?

VI. HIPÓTESIS.

De acuerdo a evidencia donde se establece que existe relación entre los polimorfismos del receptor de células NK (NKG2D) y el desarrollo de cáncer, se puede suponer que los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C en NKG2D, así como sus haplotipos estarán asociados al desarrollo de otros cánceres como las LMA y LLA.

VII. OBJETIVOS

GENERAL.

Establecer si existe asociación genética entre los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C de NKG2D en pacientes con LMA y LLA.

PARTICULARES.

- Determinar las frecuencias alélicas de los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C en pacientes con LMA y LLA, así como en población sana.
- Determinar las frecuencias genotípicas de los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C en pacientes con LMA y LLA, así como en población sana.
- Analizar entre los pacientes con LMA y LLA y la población sana, las frecuencias alélicas, así como las frecuencias genotípicas de los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C.
- Determinar si existen alelos, genotipos o haplotipos de riesgo para el desarrollo de LMA y LLA.

VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL

VIII.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de asociación genética, basado en casos y controles.

VIII.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes de ambos géneros con diagnóstico de Leucemia Mieloblástica Aguda y Leucemia Linfoblástica Aguda, que acuden al servicio de hematología del Centro Médico Nacional "Siglo XXI". Así como individuos sanos, los cuales acuden al banco de sangre del Centro Médico Nacional "Siglo XXI", como controles.

VIII.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Casos: pacientes con diagnóstico previo confirmado de LMA y LLA.

Controles: personas sanas no relacionadas familiarmente.

VIII.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Casos y controles: individuos familiarmente relacionados.

Muestras con DNA degradado después de la extracción o con baja pureza.

Muestras que no amplifican o que presentan un resultado dudoso de genotipificación.

VIII.5 MATERIAL Y MÉTODOS

VIII.5.1 Extracción de DNA genómico.

El DNA genómico se extrajo a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando el método modificado de “salting-out” [89]. Se utilizó el siguiente protocolo:

- 1.- Se dispensaron 30mL de la solución de lisis de glóbulos rojos (RBC) en un tubo Falcon de 50mL.
- 2.- Se adicionaron 10mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA, y se mezcló por inversión, 10 veces.
- 3.- Se incubó a temperatura ambiente (15 – 25°C). Invertir al menos una vez durante la incubación.
- 4.- Se centrifugó durante 2min a 2000g, para separar los glóbulos blancos.
- 5.- Se decantó el sobrenadante cuidadosamente, para dejar el botón de células blancas.
- 6.- Vortex el tubo vigorosamente para resuspender el botón en el líquido residual.
- 7.- Se adicionaron 10mL de la solución de lisis de células, vortex vigorosamente por 10s.
- 8.- Se adicionaron 3.33mL de la solución de precipitación de proteínas y vortex vigorosamente por 20s.
- 9.- Se centrifugó por 5min a 2000g.

10.- Se pipetearon 10mL de isopropanol a un tubo limpio de 50mL y adicionar el sobrenadante del paso anterior, traspasando cuidadosamente.

11.- Se mezcló invirtiendo suavemente 50 veces hasta que el DNA sea visible.

12.- Se centrifugaron por 3min a 2000g.

13.- Se decantó el sobrenadante cuidadosamente, y escurrir el tubo invirtiéndolo en una pieza de papel absorbente limpio, cuidando que el botón permanezca en el tubo.

14.- Se adicionaron 10mL de etanol al 70% e invertir varias veces, para lavar el botón.

15.- Se centrifugó durante 1min a 2000g.

16.- Se decantó el sobrenadante cuidadosamente y escurrir el tubo invirtiéndolo en una pieza de papel absorbente limpio, cuidando que el botón permanezca en el tubo. Se dejó secar al aire por 5 a 10min.

17.- Se adicionó 1mL de solución de hidratación de DNA y vortex por 5s a velocidad media.

18.- Se incubó a 65°C durante 1h para disolver el DNA.

19.- Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche con agitación suave.

VIII.5.2 Ensayos de genotipificación.

Para el análisis de los polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C (NM_001199805.1) se utilizarán ensayos de genotipificación por PCR tiempo real con sondas TaqMan® (AppliedBiosystem®). La amplificación se efectuó en placas de 96 pozos con 25µL finales de mezcla de reacción utilizando el aparato Step-One Plus® (Applied Biosystems®) y el programa de ciclado especificado por el proveedor para los polimorfismos rs2255336 y rs2246809. La preparación de las mezclas de reacción y la amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

- Preparación de la mezcla de reacción.

1.- Se calculó el volumen total de cada componente necesario para cada reacción, utilizando la tabla siguiente:

Componente	µL/ por reacción (1X)
TaqMan® Genotyping Master Mix.	12.50
20X SNP Genotyping Assay	1.25
Total	13.75

Tabla 1.- Cantidades para la preparación de la mezcla de reacción, las cantidades son exclusivamente para una reacción.

2.- Se pipetó el volumen requerido de TaqMan® Genotyping Master Mix y 20X SNP Genotyping Assay en un tubo Eppendorf apropiado, dependiendo del número de reacciones a realizar.

3.- Se centrifugó brevemente para bajar el contenido y eliminaron las burbujas de aire de la mezcla de reacción.

- Preparación de la placa (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate).

4.- Se pipetearon 13.75 µL de la mezcla de reacción a cada pozo de la placa.

5.- Una vez que se haya terminado de transferir la mezcla de reacción a cada pozo, se adicionaron 11.25µL, de la dilución de DNA a 10ng/µL de cada muestra, dentro de cada pozo. Se cargaron dos NTC (No Template Control), en estos se adicionaron 11.25µL de agua libre de nucleasas, en lugar de la dilución de DNA de la muestra.

6.- Se sellaron las placa con un adhesivo óptico (MicroAmp® Optical Adhesive Film).

7.- Se realizó la amplificación en el aparato StepOne Plus ® con las siguientes condiciones de ciclado:

	Lectura pre- PCR	Ciclado Térmico			Lectura Post-PCR
Etapa	Etapa de Espera	Etapa de Espera	Ciclado (47 ciclos)		Etapa de Espera
			Desnaturalización	Anillamiento/ Extensión	
Temperatura (°C)	60	95	92	60	60
Tiempo (mm:ss)	00:30	10:00	00:15	01:00	00:30

Tabla 2.- Condiciones de ciclado para cada polimorfismo y cada placa.

VIII.5.3 Discriminación alélica.

La discriminación alélica se realizó con el software de Applied Biosystems StepOne® Real Time PCR versión 2.3.

VIII.6 ANALISIS ESTADISTICO.

Primeramente se calcularon las frecuencias alélicas, así como las frecuencias genotípicas de casos y controles. Se realizó una prueba de χ^2 para corroborar si las frecuencias genotípicas y alélicas se encontraban bajo equilibrio de Hardy – Weinberg.

Para valorar el comportamiento de las frecuencias alélicas y genotípicas, de acuerdo al tipo de leucemia que presentan los pacientes, se dividieron los casos en dos grupos: a) LMA, pacientes con diagnóstico de LMA y b) LLA, pacientes con diagnóstico de LLA. Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para cada grupo formado.

Mediante el programa Haploview versión 4.2 [89], se evaluó si existía la formación de haplotipos entre estos dos SNP's. Posteriormente se calcularon las frecuencias de los haplotipos formados, en los casos y en los controles.

Se calculó la razón de momios utilizando el software Epidat 3.1 para los alelos, genotipos y los haplotipos. Para determinar si existe asociación entre estos y el desarrollo de leucemias agudas [90].

IX. RESULTADOS.

En la tabla 1 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP's, c.214A>G y c.-181+3191T>C para casos y controles. Las frecuencias genotípicas se calcularon agrupando a los individuos en tres genotipos diferentes para cada uno de los SNP's: a) GG homocigoto para el alelo G, b) GA heterocigoto, con un alelo G y otro A; y c) AA homocigoto para el alelo A. El **alelo de mayor frecuencia** en la población estudiada fue el **G** para los dos polimorfismos, tanto en casos como en los controles. Mientras que el **genotipo de mayor frecuencia** dentro de la población, en casos y controles, fue el **homocigoto GG** para los dos SNP's.

	Casos (n=175)		Controles (n=235)	
	c.214A>G	c.-181+3191T>C	c.214A>G	c.-181+3191T>C
Frecuencias genotípicas	GG 145 (0.83)	GG 142 (0.81)	GG 195 (0.829)	GG 198 (0.842)
	GA 28 (0.16)	GA 31 (0.18)	GA 39 (0.166)	GA 36 (0.153)
	AA 2 (0.01)	AA 2 (0.01)	AA 1 (0.004)	AA 1 (0.004)
Frecuencias alélicas	G 318 (0.91)	G 315 (0.90)	G 429 (0.91)	G 432 (0.92)
	A 32 (0.09)	A 35 (0.10)	A 41 (0.09)	A 38 (0.08)

Tabla 3.- Resultados de las frecuencias alélicas y genotípicas de los dos SNP's tanto en casos como en controles. Dentro de los casos se encuentra agrupados tanto pacientes con LMA como con LLA.

Al separar los casos en dos grupos, de acuerdo a su diagnóstico, y calculando las frecuencias alélicas y genotípicas de cada de grupo, se obtienen los resultados que se muestran en la tabla 2. En el grupo de LMA como en LLA, el **alelo de mayor frecuencia fue el G** y el **genotipo de mayor frecuencia fue el homocigoto para el alelo G**, para los dos SNP's.

Casos (n=175)					
		LLA (n=110)		LMA (n=65)	
		c.214A>G	c.-181+3191T>C	c.214A>G	c.-181+3191T>C
Frecuencias genotípicas	GG	92 (0.84)	90 (0.82)	53 (0.82)	52 (0.80)
	GA	18 (0.16)	20 (0.18)	10 (0.15)	11 (0.17)
	AA	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (0.03)	2 (0.03)
Frecuencias alélicas	G	202 (0.92)	200 (0.91)	116 (0.89)	115 (0.88)
	A	18 (0.08)	20 (0.09)	14 (0.11)	15 (0.12)

Tabla 4.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los dos SNP's para los pacientes, estos se dividieron en dos grupos, de acuerdo a su diagnóstico en: a) LMA, pacientes con diagnóstico de LMA y b) LLA, pacientes con diagnóstico de LMA.

Al analizar los datos con el programa Haploview se determinó la formación de un bloque de haplotipos entre los dos SNP's con un valor de **desequilibrio de**

ligamiento (LD) del 92%. En la figura 6 se muestra la formación del bloque de haplotipo formado entre los dos SNP's. Los haplotipos formados fueron cuatro: a) GG, donde en la posición de los dos SNP's existe una G, b) AG donde en la posición del SNP c.214A>G existe una A mientras que en la posición del c.-181+3191T>C existe una G, c) GA donde en la posición del SNP c.214A>G existe una G mientras que en la posición del SNP c.-181+3191T>C existe una A y d) AA donde en la posición de los dos SNP's existe una A.

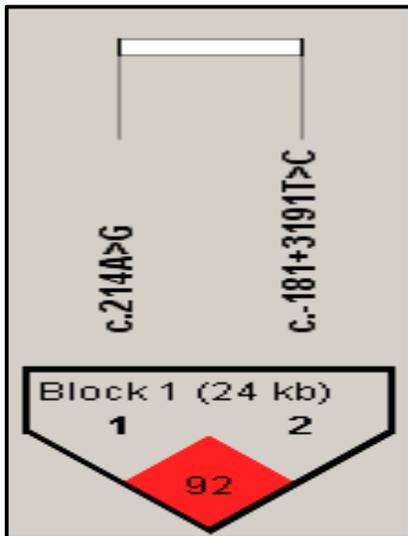


Figura 6.- Se muestra la formación de un bloque de haplotipos entre los dos SNP's. El valor dentro del rombo rojo es el valor de LD.

El **haplotipo de mayor frecuencia** en la población estudiada fue el **GG** tanto en casos como en los controles. En la tabla 3 se muestran las frecuencias de los haplotipos formados entre estos SNP's.

CASOS (n=175)				
	Totales (n=175)	LMA (n=65)	LLA (n=110)	Controles (n=235)
Frecuencias de los haplotipos.	GG 314 (0.897)	GG 115 (0.884)	GG 199 (0.9045)	GG 428 (0.91)
	AG 4 (0.01)	AG 1 (0.008)	AG 3 (0.0045)	AG 4 (0.009)
	GA 1 (0.003)	GA 0 (0.000)	GA 3 (0.014)	GA 1 (0.002)
	AA 31 (0.09)	AA 14 (0.108)	AA 17 (0.08)	AA 37 (0.079)

Tabla 5.- Frecuencias de los haplotipos formados en la población estudiada. Los casos se muestran de tres maneras, a) Totales que agrupan tanto pacientes con diagnóstico de LMA como LLA, b) LMA, pacientes con diagnóstico de LMA y c) LLA, pacientes con diagnóstico de LLA.

FOREST PLOT PARA LOS ALELOS

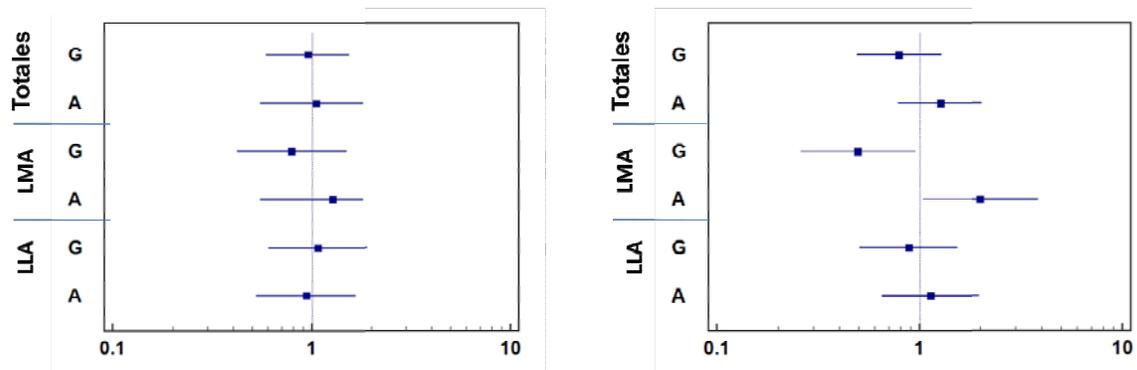


Figura 7.- Forest Plots para los alelos. Se grafican las razones de momios así como sus intervalos de confianza en escala logarítmica, de los genotipos para los casos totales, y después separados por su diagnóstico del tipo de leucemia en LLA y LMA. (A) Polimorfismo c.214A>G y (B) Polimorfismo c.-181+3191T>C, en este polimorfismo al separar los pacientes con diagnóstico de LMA se logró asociar significativamente ($p=0.0548$) este polimorfismo con el desarrollo de LMA.

FOREST PLOT PARA LOS GENOTIPOS

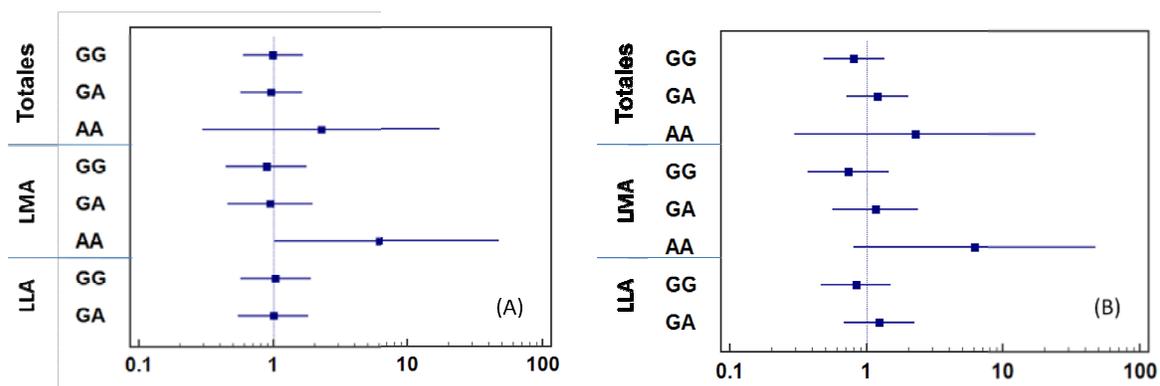


Figura 7.- Forest Plots para los genotipos. Se grafican las razones de momios de los genotipos, así como sus intervalos de confianza en escala logarítmica; para los casos totales, y después separados por su diagnóstico del tipo de leucemia en LLA y LMA., ninguno resultado con valor estadísticamente significativo. (A) Polimorfismo c.214A>G y (B) Polimorfismo c.-181+3191T>C.

Al calcular las razones de momios para los genotipos, alelos y haplotipos presentes en la población (valores mostrados en tablas anexas A1 a A9), se determinó que existe una asociación entre el polimorfismo c.-181+3191T>C y el desarrollo de LMA. Resultando que el **alelo G es un alelo de protección** (OR 0.4969, IC 0.2590 – 0.9525, p 0.0548), mientras que el **alelo A es un alelo de riesgo** (OR 2.0124, IC 1.0401 – 3.8608, p 0.0548) para el desarrollo de LMA.

XI. ANALISIS DE RESULTADOS.

El mecanismo por el cual las células NK regulan el desarrollo de las enfermedades hemato – oncológicas aun no se encuentra deslumbrado. Aunque se han planteado dos posibles mecanismos. En el primero los ligandos del receptor NKG2D se encuentran subexpresados en las células tumorales para burlar los mecanismos de la inmunidad innata y en el segundo mecanismo los NKR en la célula NK se encuentran subexpresados, lo que conllevaría a que el reconocimiento de la célula tumoral con la célula NK sea deficiente.

En estudios recientes se ha relacionado la disminución en la expresión de los ligandos del receptor NKG2D, principalmente a MICA, con algunas patologías hemato – oncológicas como son: LMA, LLA, LLC y LMC. [99, 100]. Los estudios realizados solo han sido funcionales, donde se evalúan los niveles de expresión de los ligandos de NKG2D con la actividad citotóxica de la célula NK. A nivel genómico, en estudios amplios del genoma (GWAS) se han asociado algunos polimorfismos en MICA con el desarrollo de algunas leucemias como leucemia crónica granular de células T grandes [101].

En lo referente NKR´s, existen algunos estudios donde se relacionan la expresión deficiente de los receptores KIR en LMA, LLA, LMC y LLC [102]. En lo referente al receptor NKG2D no existe ningún estudio que los asocie con el desarrollo de ninguna leucemia, pero si con otras patologías como es el caso de artritis reumatoide, carcinoma hepatocelular y carcinoma cervical [87 – 89]. En lo referente a enfermedades hemato – oncológicas se ha determinado que algunas

disfunciones en los NKR's están presentes en algunas de estas patologías hematológicas [90 – 94]. En este estudio de acuerdo a los resultados se determinó que el polimorfismo **c.-181+3191T>C** presenta asociación con el desarrollo de **LMA**.

El polimorfismo c.-181+3191T>C se encuentra localizado en la región intergénica del receptor que codifica el receptor NKG2D (KLRK1) y NKG2F. En esta región intergénica se localiza la región promotora para el receptor NKG2D. Este cambio de base G → A en la región promotora del gen KLRK1 conllevaría a una posible disminución en la expresión del receptor NKG2D. En estudios anteriores de citotoxicidad mediada por células, donde se expuso a células NK con la línea tumoral K526, se determinó que SNP's o haplotipos de SNP en el NKC, donde se encuentra el polimorfismo c.-181+3191T>C, pueden disminuir o aumentar la actividad citotóxica de la célula NK [103]. Este experimento "in vitro" corrobora que el polimorfismo c.-181+3191T>C disminuye la actividad citotóxica de la célula NK. Aunque este polimorfismo "in vitro" disminuye la actividad citotóxica de la célula NK, para corroborar que la célula NK de pacientes con LMA que presentan el alelo A en el polimorfismo c.-181+3191T>C, se deberían de realizar ensayos de citotoxicidad de células tumorales de los pacientes con LMA enfrentadas contra las células NK del mismo paciente y por separado las células tumorales contra células NK de controles sanos.

XII. CONCLUSIONES

Se logró calcular la frecuencia de los dos polimorfismos c.214A>G y c.-181+3191T>C en población mexicana. Resultando el alelo G de mayor frecuencia para los dos polimorfismos.

Al analizar los datos para calcular si existe formación de haplotipos, se obtuvo la formación de un haplotipo entre los dos SNP's.

Aunado a esto se logro determinar asociación entre el polimorfismo c. -181+3191T>C y el desarrollo de LMA. Obteniéndose el alelo A, como alelo de riesgo para el desarrollo de LMA.

XIII. REFERENCIAS.

- [1] Torok B. Cellular interactions. Blood 1988; 72: 373 – 385.
- [2] Cobo F, García J. Hematología. Del laboratorio a la práctica clínica. Alcalá; 2010: 17 – 333.
- [3] Mayani H, Flores E, Pelayo R, Montesinos J, Flores P, Chávez A. Hematopoyesis. Cancerología 2007; 2: 95 – 107.
- [4] Tirado L, Mohar A. Epidemiología de las neoplasias hemato – oncológicas. Cancerología 2007; 2: 109 – 120.
- [5] Rodak B. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2004.
- [6] McKenzie S. Hematología clínica. 2ª ed. México DF: El manual moderno, 2006.
- [7] Ruíz G. Fundamentos de hematología. 4ª ed. México DF: Médica Panamericana, 2009.
- [8] Labardini J, Cervera E, López O, Corrales C, Balbuena M, Barbosa A, Espinoza J, Medina C, Ojeda J, Ramírez A, Rivas S, Sánchez S, Siñani M, Zapata P, Hernández M, Cortés J. Oncoguía leucemia linfoblástica aguda. Cancerología 2011; 6: 111 – 115.
- [9] Ojeda J, Balbuena M, Barbosa A, Cervera E, Corrales C, Espinoza J, Labardini J, López O, Medina C, Ramírez A, Rivas S, Sánchez S, Cárdenas M, Zapata N,

Hernández M, Cortés J. Oncoguía leucemia mieloblástica aguda. *Cancerología* 2011; 6: 99 -102.

[10] Fauriat C, Long E, Ljunggren H, Bryceson Y. Regulation of human NK- cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010; 115: 2167-76.

[11] Vivier E, Tornasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 503-10.

[12] Rosenberg E, Herberman R, Levine P, Halterman R, McCoy J, Wunderlich J. Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int J Cancer* 1972; 9: 648-658.

[13] Timonen T, Saksela E. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods* 1980, 36: 285.

[14] Timonen T, Ortaldo J, Heberman RB. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 1981, 153: 569.

[15] Lanier L, Phillips J, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 1986: 137: 2735.

[16] Ritz J, Schmidt R, Michon J, Hercend T, Scholssman S. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 1988: 42: 181.

[17] Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989: 42: 181.

[18] Herberman R, Nunn M, Holden H, Lavrin D. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngenic and allogenic tumors, II: characterization of effector cells. *Int J Cancer* 1975; 16: 230-239.

[19] Ozer H, Strelkauskas A, Callery R, Schlossman S. The functional dissection of human peripheral blood null cells with respect to cytotoxicity and natural killing. *Eur J Immunol* 1979, 9: 112.

[20] Walker J, Barlow J, McKenzie A. Innate lymphoid cells-how did we miss them? *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 75-87.

[21] Caligiuri M. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112: 461-469.

[22] De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revising human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56^{dim}CD16⁺ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 728-32.

[23] Cooper M, Fehniger T, Caligiuri M. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22(11): 633 – 640.

[24] Lanier L, Le A, Civin C, Loken M, Phillips J. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 4480 – 4486.

[25] Blanchard D, Stewart W, Klein T, Friedman H, Djeu J. Cytolytic activity of human peripheral blood leukocytes against *Legionella pneumophila* – infected monocytes: characterization of the effector cell and augmentation by interleukin 2. *J Immunol* 1987; 139: 551- 556.

[26] Blanchard D, Michelini-Norris M, Friedman H, Djeu J. Lysis of mycobacteria-infected monocytes by IL-2 activated killer cells, role of LFA-1. *Cell Immunol* 1989; 119: 402-411.

[27] Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante N. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002; 195: 335-341.

[28] Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nissi C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 327-33.

[29] Ferlazzo G, Tsang M, Moretta L, Melioli G, Steinman R, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002; 195: 343-351.

[30] Henkart M, Henkart P. Lymphocyte mediated cytotoxicity as a secretory phenomenon. *Adv Exp Med Biol* 1982; 146: 227.

[31] Henkart P. Mechanism of lymphocyte mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 1985; 3: 31.

[32] Young J, Cohn Z, Podack E. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin) from cytotoxic T cells: Structural, immunological and functional similarities. *Science* 1986; 233: 184.

[33] Wong P, Pamer E. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 29-70.

-
- [34] Boon T, Cerottini J, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 337-365.
- [35] Hewitt E. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 2003; 110: 163-169.
- [36] García-Lora A, Agarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 2003; 195: 346 – 355.
- [37] Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari M, Moretta A. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 2002; 4: 1539 – 1544.
- [38] Ljunggren H, Karre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11(7): 237 – 244.
- [39] Lanier L. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 225 – 274.
- [40] Topham N, Hewitt W. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunol* 2009; 128: 7 – 15.
- [41] Stinchcombe J, Griffiths G. Secretory mechanisms in cell – mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 495 – 517.
- [42] Burkhardt J, Hester S, Lapham C, Argon Y. The lytic granules of natural killer cells are dual – function organelles combining secretory and pre – lysosomal compartments. *J Cell Biol* 1990; 111: 2327 – 2340.
- [43] Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett* 2007; 108: 10 – 19.

[44] Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 389 – 420.

[45] Pipkin M, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 301 – 308.

[46] Lieberman J. The ABC's of granule – mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 361 – 370.

[47] Trapani J, Bird P. A renaissance in understanding the multiple and diverse functions of granzymes. *Immunity* 2008; 29: 665 – 667.

[48] Rouzair P, Mayol K, Viel S, Bienvenu J, Walzer T. Homéostasie des cellules natural killer. *Médecine sciences* 2012; 28: 403 – 408.

[49] Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 2001; 181: 203 – 214.

[50] Hudspeth K, Silva – Santos B, Mavilio D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol* 2013; 4: 69.

[51] Colona M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*, 1995; 268: 405 – 408.

[52] D'Andrea A, Chang C, Franz – Bacon K, McClanahan T, Phillips J, Lanier L. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA – B alloypes. J Immunol 1995; 155: 2306 – 2310.

[53] Campbell K, Purdy A. Structure/ function of human killer cell immunoglobulin – like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. Immunol 2011; 132: 315 – 325.

[54] Steffens U, Vyas Y, Dupont B, Selvakumar A. A nucleotide and amino acid sequence alignment for human killer cell inhibitory receptors (KIR). Tissue Antigens 1998; 51: 398 – 413.

[55] Wilson M, Torkar M, Trowsdale J. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. Tissue Antigens 1997; 49: 574 – 579.

[56] Liu W, Kim J, Nwankwo C, Ashworth L, Arm J. Genomic organization of the human leukocyte immunoglobulin-like receptors within the leukocyte receptor complex on chromosome 19q13.4. Immunogenetics 2000; 51: 659 – 669.

[57] Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. Mammalian genome 1999; 10 (2): 154 – 160.

[58] Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. Immunol 2009; 129: 8 – 19.

[59] Tomasello E, Viver E. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. Eur J Immunol 2005; 35: 1670 – 1677.

[60] MacFarlane A, Campbell K. Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298: 23 – 57.

[61] Raulet D, Vance R. Self – tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 520 – 531.

[62] Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk C, Roetynck S, Stewart A, Breso V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006; 25: 331 – 342.

[63] Brodin P, Karre K, Hoglund P. NK cell education: not an on – off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol* 2009; 30: 143 – 149.

[64] Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari M, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK – cell – mediated cytotoxicity. *Trends Immunol* 2000; 21(5): 228 – 234.

[65] Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari M, Moretta L. Receptors for HLA – class I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 619 – 648.

[66] Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Pende D, Vitale M, Poggi A, Mingari M, Moretta L. Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev* 1997; 155: 105 – 117.

[67] Ciccone E, Pende D, Vitale M, Nanni L, Di Donato C, Bottino C, Morelli L, Viale O, Amoroso A, Moretta A, Moretta L. Self class I molecules protect normal

cells from lysis mediated by autologous natural killer cells. *J Immunol* 1994; 24: 1003 – 1006.

[68] Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. p46 a novel natural killer cell – specific molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 1997; 186: 1129 – 1136.

[69] Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R, Moretta A. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1998; 188: 953 – 960.

[70] Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R. NKp44 a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 1999; 189: 787 – 796.

[71] Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, Marcenaro E. TLR/NCR/KIR: which one to use and when? *Front Immunol* 2014; 5: 105.

[72] Loris R. Principles of structure of animal and plant lectins. *BBA* 2002; 1572: 198 -208.

[73] Zelensky A, Gready J. The C – type lectin – like domain superfamily. *FEBS* 2005; 272: 6179 – 6217.

[74] Brostjan C, Sobanov Y, Glienke J, Hayer S, Lehrach H, Francis F, Hofer E. The NKG2 natural killer cell receptor family: comparative analysis of promoter sequences. *Genes Immun* 2000; 1(8): 504 -508.

[75] Houchins J, Yabe T, McSherry C, Bach F. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991; 173: 1017 – 1020.

[76] Schnittger S, Hamann J, Dannenberg C, Fiebig H, Strauss M, Fonatsch C. Regional sublocalization of the human CD69 gene to chromosome bands 12p12.3-p13.2, the predicted region of the human natural killer cell gene complex. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2711 – 2713.

[77] Suto Y, Yabe T, Maenaka K, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T. The human natural killer gene complex (NKC) is located on chromosome 12p13.1-p13.2. *Immunogenetics* 1997; 46 (2): 159 – 162.

[78] Plougastel B, Trowsdale J. Cloning of NKG2 – F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2835 – 2839.

[79] Brooks A, Posch P, Scorzelli C, Borrego F, Colligan J. NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* 1997; 185: 795 – 800.

[80] Lazetic S, Chang C, Houchins J, Lanier L, Phillips J. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 1996; 157: 4741 – 4745.

[81] Borrego F, Kabat J, Kim D, Lieto L, Maasho K, Peña J, Solana R, Coligan J. Structure and function of histocompatibility complex (MHC) class I specific

receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 2001; 38: 637 – 660.

[82] Sullivan L, Clements C, Beddoe T, Johnson D, Hoare H, Lin J, Huyton T, Hopkins E, Reid H, Wilce M, Kabat J, Borrego F, Coligan J, Rossjohn J, Brooks A. The heterodimeric assembly of the CD94 – NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen – E recognition. *Immunity* 2007; 27: 900 – 911.

[83] Nowbakht P, Ionescu M, Rohner A, Kalberer C, Rossy E, Mori L, Cosman D, De Libero G, Wodnar A. 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; 105(9): 3615 – 3622.

[84] Groth V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12445 – 12450.

[85] Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; 279: 1737 – 1740.

[86] Lopez C, Suárez B, Lopez A, Lopez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008; 14(4): 179 – 189.

[87] Araújo A, Pereira R, Henrique M, Theresa M, Abreu L. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011; 33(3): 216 – 220.

[88] Secretaría de salud. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. 2011.

[89] Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16(3): 1215.

[90] Gabriel S, Schaffner S, Nguyen H, Moore J, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Neen S, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander E, Daly M, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296: 2225 – 2229.

[91] Lazcano E, Salzar E, Hernández M. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud pública de México* 2001; 43(2): 135 – 150.

[92] Hong W, Hui X, Min L. The correlation between NK cell and liver function in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Gut and liver* 2014, 8(3): 298 – 305.

[93] Roszak A, Lianeri M, Jagodzinski P. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with cervical carcinoma.

[94] Costello R, Sivori S, Marcenaro E, Lafage M, Mozziconacci M, Reviron D. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99: 3661 – 3667.

[95] Sanchez C, Le Treut T, Boehrer A, Knoblauch B, Imbert J, Olive D. Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 1 -13.

[96] Costello R, Fauriat C, Sivori S, Marcenaro E, Olive D. NK cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends Immunol* 2004; 25: 328 – 333.

[97] Rey J, Veuillen C, Vey N, Bouabdallah R, Olive D. Natural killer and gamma delta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends Mol Med* (2009) 15:275–84.

[98] Baier C, Fino A, Sanchez C, Farnault L, Rihet P, Kahn B, Costello R. Natural killer cells modulation in hematological malignancies. *Front Immunol* 2013; 4: 459.

[99] Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 2002 -2007.

[100] Nowbakht P, Ionescu M, Rohner A, Kalberer C, Rossy E, Mori L, Cosman D, De Libero G, Wodnar A. 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; 105(9): 3615 – 3622.

[101] Orsi L, Rudant J, Bonaventure A, Goujon S, Corda E, Evans T, Petit A, Bertrand Y, Nelken B, Robert A, Michael G, Sirvent N, Chastagner P, Ducassou S, Riolland X, Milne E, Scott R, Baruchel A, Calvel J. Genetic polymorphisms and

childhood acute lymphoblastic leukemia: GWAS of the ESCALE study (SFCE).
Leukemia 2012: 1.

[102] Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. Cancer Res 2006; 66(1): 563 – 570.

[103] Hilpert J, Groosse L, Grunebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, Steinle A, Rainer H. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D mediated NK cell response. J Immunol 2012: 1360 – 1371.

IX.- ANEXOS.

SNP	Genotipo	OR	IC	P
c.214A>G	GG	0.9914	0.5914 - 1.6616	0.9201
	GA	0.9572	0.5653 - 1.6271	0.979
	AA	2.2526	0.2948 - 17.2160	0.7674
c.-181+3191T>C	GG	0.8036	0.4825 - 1.3382	0.4814
	GA	1.1914	0.7091 - 2.0024	0.6006
	AA	2.2526	0.2948 - 17.2160	0.7674

Tabla A1.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los genotipos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes, tanto con diagnóstico de LMA como LLA.

SNP	Genotipo	OR	IC	p
c.214A>G	GG	0.8867	0.4429 - 1.7715	0.8786
	GA	0.9412	0.4536 - 1.9572	0.9782
	AA	6.1549	1.0150 - 47.4836	0.1703
c.-181+3191T>C	GG	0.7347	0.3704 - 1.4544	0.4907
	GA	1.1533	0.5639 - 2.3641	0.8460
	AA	6.1549	0.7978 - 47.4836	0.1703

Tabla A2.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los genotipos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes solo con diagnóstico de LMA.

SNP	Genotipo	OR	IC	p
c.214A>G	GG	1.0358	0.5697 – 1.8815	0.9690
	GA	0.9949	0.5467 – 1.8122	0.8904
	AA			
c.-181+3191T>C	GG	0.8340	0.4632 – 1.5006	0.6554
	GA	1.2381	0.6827 – 2.2344	0.5832
	AA			

Tabla A3.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los genotipos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes solo con diagnóstico de LLA. No fue posible calcular la razón de momios para los genotipos homocigotos para A, debido a que ningún paciente con LLA presenta este genotipo.

SNP	Alelos	OR	IC	p
c.214A>G	G	0.9497	0.5871 – 1.5363	0.9325
	A	1.0529	0.5467 – 1.8122	0.9325
c.-181+3191T>C	G	0.7917	0.4908 - 1.2770	0.4074
	A	1.2632	0.7831 – 2.0376	0.4074

Tabla A4.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los alelos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes, tanto con diagnóstico de LMA como LLA.

SNP	Alelos	OR	IC	P
c.214A>G	G	0.7919	0.4207 – 1.4891	0.5866
	A	1.2628	0.5467 – 1.8122	0.5866
c.-181+3191T>C	G	0.4969	0.2590 – 0.9525	0.0548*
	A	2.0124	1.0401 – 3.8608	0.0548*

Tabla A5.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los genotipos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes solo con diagnóstico de LMA. Se muestra un valor estadísticamente significativo para el SNP c.-181+3191T>C.

SNP	Alelos	OR	IC	P
c.214A>G	G	1.0725	0.6048 – 1.9008	0.9275
	A	0.9324	0.5261 – 1.6533	0.9275
c.-181+3191T>C	G	0.8796	0.5018 – 1.5411	0.7668
	A	1.1368	0.6489 – 1.9926	0.7354

Tabla A6.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los genotipos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes solo con diagnóstico de LLA.

Haplotipos	OR	IC	P
GG	0.8559	0.5358 – 1.3629	0.5953
AG	0.3338	0.0371 – 2.2343	0.5652
GA	5.4220	0.0603 – 48.7236	0.2154
AA	1.1372	0.6907 – 1.8652	0.7056

Tabla A7.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los haplotipos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes, tanto con diagnóstico de LMA como LLA.

Haplotipos	OR	IC	P
GG	0.7523	0.4058 – 1.3934	0.4675
AG	3.6357	0.2259 – 58.5241	0.9087
GA			
AA	1.4124	0.7454 – 2.6789	0.384

Tabla A8.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los haplotipos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes solo con diagnóstico de LMA. No fue posible calcular la razón de momios del haplotipos GA, debido a que no existe ningún paciente con LMA que presente este haplotipo.

Haplotipos	OR	IC	P
GG	0.9299	0.5391 – 1.6032	0.9067
AG	0.5320	0.0591 – 3.5683	0.9277
GA	6.4839	0.9219 – 62.6900	0.1876
AA	0.9800	0.5429 – 1.7701	0.9315

Tabla A9.- Valores de la razón de momios (OR), el índice de confianza (IC) y el valor de p, para los haplotipos, cuando se consideran los datos totales de los pacientes solo con diagnóstico de LLA.