



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
CURSO MAESTRÍA DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA  
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA

**IMPACTO DE KIR Y HLA CLASE-I EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE  
ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRES EN PACIENTES CON MALIGNIDADES  
HEMATOLÓGICAS**

Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al Título de Magister Scientiarum  
en Inmunología Clínica

Yuniet Andreina Virla Molero

Tutor: Paolo Tassinari

Co-Tutora: Angela Conesa

Caracas, Marzo 2012

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE MEDICINA  
CURSO DE MAESTRÍA EN INMUNOLOGÍA CLÍNICA  
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA**

Dr. Paolo Tassinari  
Tutor

Lic. Angela Conesa  
Co- Tutora

Dra. Mercedes Zabaleta  
Directora de la Maestría de Inmunología Clínica

Dr. Leopoldo Deibis  
Coordinador de la Maestría de Inmunología Clínica

Lic. Joana Martín Rojo  
Asesora Estadística

## **AGRADECIMIENTOS**

Debo agradecer al Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela y a todos sus integrantes, por contribuir de distintas maneras en mi formación durante estos 3 inolvidables años.

Agradezco especialmente a todos mis profesores por ser mi mejor ejemplo. A mis tutores, el Dr. Paolo Tassinari y la Profesora Angela Conesa por la confianza que depositaron en mí para la realización de esta tesis. A la Dra. Mercedes Fernández, quien realizó la donación imprescindible de los estuches para KIR. A las licenciadas Ligia Gámez y María Paredes quienes me ayudaron y guiaron en mis días de laboratorio. Al Dr. Ramírez y al Dr. Caldera, notables Hemato-oncólogos quienes nos permitieron acceder a sus pacientes trasplantados y, finalmente, al personal del Hospital de Clínicas Caracas y a Fundamédula, ambas instituciones valiosas que velan por el bienestar de pacientes con malignidades hematológicas.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
Marco teórico.....	18
Hipótesis.....	41
Objetivo General.....	42
Objetivos Específicos.....	42
<b>MÉTODOS</b> .....	43
Nivel y Tipo de Investigación.....	43
Población y muestra.....	43
Procedimientos .....	44
Tipo de muestra .....	44
Técnica de extracción de ADN .....	44
Determinación de la concentración, radio y absorbancia de cada muestra .....	45
Estudio del genotipaje de KIR .....	45
Amplificación por PCR.....	46
Electroforesis en gel .....	47
Visualización del amplificado .....	48
Estudio de HLA-C .....	48

Ficha de recolección de la información .....	48
Tratamiento Estadístico .....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	50
Características generales de los pacientes .....	50
Características de los donantes.....	51
Generalidades de los estudios pre-trasplante .....	52
Tratamientos .....	54
Características inherentes al trasplante .....	55
Evolución general de los pacientes en el post-trasplante .....	59
Estudio genético de Receptor tipo Inmunoglobulina de NK (KIR) .....	66
Evaluación de HLA como ligando de KIR .....	76
Evaluación de Recaídas, Fallecimientos y Supervivencia .....	77
<b>DISCUSIÓN</b> .....	85
<b>CONCLUSIONES</b> .....	102
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	104
<b>REFERENCIAS</b> .....	107
<b>ANEXOS</b> .....	113

## ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

### TABLAS

Tabla N° 1. Trasplantes realizados en la Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera (CHET) entre 1987 y 2010 .....	15
Tabla N° 2. Trasplantes realizados en el Hospital de Clínicas Caracas entre 2000 y 2010 .....	15
Tabla N° 3. Trasplantes realizados por el Programa de cooperación PDVSA-Fundación de Trasplante de M.O Italia entre 2007 y 2010 .....	15
Tabla N° 4. Ejemplos de receptores de Células Citotóxicas Naturales .....	19
Tabla N° 5. Moléculas KIR y sus Ligando .....	25
Tabla N° 6. Resumen de KIR y HLA asociado a enfermedad .....	29
Tabla N° 7. Características Demográficas y Clínicas de los pacientes .....	50
Tabla N° 8. Características de los donantes .....	52
Tabla N°9. Régimen de acondicionamiento para el trasplante .....	54
Tabla N°10. Regímenes Mieloablativos aplicados a los pacientes .....	55
Tabla N°11. Vía de obtención del injerto .....	56
Tabla N°12. Dosis de células CD34+ infundidas a los receptores de trasplante .....	57
Tabla N°13. Enfermedad de injerto contra huésped en pacientes del estudio.....	60
Tabla N°14. Clasificación de la Enfermedad de injerto contra huésped .....	60
Tabla N°15. Afectación orgánica en pacientes con diagnostico de Enfermedad crónica de Injerto contra huésped .....	61
Tabla N°16. Pacientes trasplantados con Recaídas en el post-trasplante .....	62

Tabla N°17. Tiempo transcurrido entre el trasplante y las recaídas .....	63
Tabla N°18. Duración de la remisión post-trasplante hasta la presencia de recaídas .....	64
Tabla N°19. Mortalidad de pacientes hasta la última evolución clínica .....	65
Tabla N°20. Frecuencia de distintos genotipos encontrados en los receptores .....	70
Tabla N°21. Frecuencia de distintos genotipos encontrados en los donantes .....	71
Tabla N°22. Frecuencia de ligandos HLA-A en la población de estudio .....	76
Tabla N°23. Frecuencia de ligandos HLA-B en la población de estudio .....	76
Tabla N°24. Frecuencia de ligandos HLA-C en la población de estudio .....	77
Tabla N°25. Recaídas asociadas a grupos con similitud y diferencias en haplotipos y genotipos .....	78
Tabla N°26. Fallecimientos asociados a grupos con similitud y diferencias en haplotipos y genotipos .....	79
Tabla N°27. Tiempo de Supervivencia sin eventos según grupos genéticos .....	80
Tabla N°28. Supervivencia con eventos según grupos genéticos .....	82
Tabla N°29. Recaídas en el tiempo según grupos genéticos .....	84
Tabla N°30. Genotipos KIR de receptores, reportados y no reportados previamente en Venezuela .....	92
Tabla N°31. Genotipos KIR de donantes, reportados y no reportados previamente en Venezuela .....	93

## GRÁFICOS

Gráfico N°1. Ubicación cromosómica de KIR .....	20
Gráfico N°2. Estructura básica de KIR .....	21
Gráfico N°3. Organización de los dominios de KIR .....	22
Gráfico N°4. Secuencia genómica de haplotipos KIR .....	24
Gráfico N°5. Alorreactividad de NK de donante contra receptor .....	32
Gráfico N°6. Modelo de incompatibilidad del Ligando KIR o modelo Ligando-Ligando .....	38
Gráfico N°7. Modelo de Ligando-Receptor .....	39
Gráfico N°8. Modelo de Pérdida del ligando .....	39
Gráfico N°9. Modelo Gen-Gen KIR .....	40
Gráfico N°10. Diagnósticos de enfermedades hematológicas malignas .....	51
Gráfico N°11. Compatibilidad de grupos sanguíneos .....	53
Gráfico N°12. Vía de obtención del injerto .....	56
Gráfico N°13. Dosis de células CD34+ infundidas a los receptores de trasplante .....	58
Gráfico N°14. Número de colectas para obtener el injerto .....	59
Gráfico N°15. Diagnóstico de mucositis en pacientes post-trasplantados .....	59
Gráfico N°16. Grado de severidad de la EICH .....	62
Gráfico N°17. Tiempo transcurrido entre el trasplante y las recaídas .....	63
Gráfico N°18. Causas de mortalidad de los pacientes .....	66

Gráfico N°19. Genotipos y haplotipos KIR de pacientes receptores de trasplante de células madre hematopoyética .....	67
Gráfico N°20. Genotipos y haplotipos KIR de donantes de trasplante de células madre hematopoyética .....	68
Gráfico N°21. Genes KIR en Donante # 8 .....	69
Gráfico N°22. Genes KIR en Receptor # 28 .....	69
Gráfico N°23. Frecuencia del total de haplotipos Bx y haplotipos AA .....	73
Gráfico N°24. Haplotipos KIR compatibles (AA-AA y Bx-Bx) y no compatibles (AA-BX y Bx-AA) entre donantes y receptores .....	74
Gráfico N°25. Combinaciones de haplotipos KIR (AA-Bx y Bx-AA) en parejas de donantes y receptores incompatibles .....	74
Gráfico N°26. Frecuencia de combinaciones de haplotipos KIR (AA-AA y Bx-Bx) en parejas de donantes y receptores compatibles .....	74
Gráfico N°27. Parejas con haplotipo compatible Bx-Bx pero con genotipos distintos .....	75
Gráfico N°28. Tendencia de sobrevivencia sin eventos en el tiempo según distintos grupos genéticos .....	80
Gráfico N°29. Tendencia de sobrevivencia con eventos en el tiempo según distintos grupos genéticos .....	81

Gráfico N°30. Tendencia de sobrevivencia en el tiempo frente a las recaídas según grupos genéticos

.....83

## ANEXOS

ANEXO N°1. Concentraciones y radios de las muestras de ADN de Receptores .....114

ANEXO N°2. Concentraciones y radios de las muestras de ADN de Donantes .....115

ANEXO N°3. Ficha de recolección de datos (Receptor) .....116

ANEXO N°4. Ficha de recolección de datos (Donante) .....118

ANEXO N°5. Lugar de nacimiento de los pacientes del estudio (n=40) .....119

ANEXO N°6. Antecedente patológicos de los pacientes del estudio (n=40) .....119

ANEXO N°7. Compatibilidad de HLA-A entre Receptores y Donantes correspondientes .....120

ANEXO N°8. Compatibilidad de HLA-B entre Receptores y Donantes correspondientes .....121

ANEXO N°9. Compatibilidad de HLA-C entre Receptores y Donantes correspondientes .....122

ANEXO N°10. Parejas con Incompatibilidad ABO (n=7) .....123

ANEXO N°11. Compatibilidades del factor RH+ y RH- entre parejas de donantes y receptores (n=40)

.....123

ANEXO N°12. Hoja de Trabajo del estuche KIR Genotyping SSP Kit .....124

ANEXO N°13. Presencia de recaídas asociadas a diferentes variables del estudio (n=35) .....125

ANEXO N°14. Fallecimientos asociados a diferentes variables del estudio (n=35) .....125

## RESUMEN

### IMPACTO DE KIR Y HLA CLASE-I EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRES EN PACIENTES CON MALIGNIDADES HEMATOLÓGICAS

**Introducción:** Actualmente se discute la alorreactividad de la célula NK del donante contra el receptor. Se cree que puede mejorar el resultado de los trasplantes entre individuos HLA idénticos para controlar la recaída en la leucemia, por lo que descifrar el rol de la alorreactividad de NK ofrecería una mejoría dramática al resultado del trasplante.

**Objetivo:** Determinar la evolución de receptores de trasplante de células madres hematopoyéticas alogénico, a partir de la relación con sus donantes HLA idénticos en el contenido de genes KIR y HLA clase I.

**Métodos:** Extracción de ADN por AXYGEN® a 40 muestras de sangre de pacientes y a sus 40 donantes. Genotipaje de KIR por técnica SSP Invitrogen®. Determinación de HLA-C por técnica SSP Olerup®. Recolección en fichas de datos de historias clínicas. Estudio estadístico: Tablas de contingencia, ANOVA, análisis de sobrevivencia por método de Kaplan-Meier.

**Resultados:** Las parejas de donantes y receptores con igual haplotipo activador pero diferencias genóticas presentaron mayor sobrevivencia sin eventos, con eventos y menor recaídas que aquellos con otras combinaciones genéticas y con Pérdida del ligando de KIR.

**Conclusión:** El modelo Gen-Gen KIR predijo mejor alorreactividad que el de Pérdida del ligando.

**Palabras Clave:** Receptor tipo Inmunoglobulina de NK (KIR), Antígeno leucocitario humano (HLA), Trasplante, Malignidad hematológica.

## INTRODUCCIÓN

El término trasplante se refiere al acto de transferir células, tejidos u órganos desde un sitio a otro, pudiendo ser alogénico (entre individuos de la misma especie), singénico (entre individuos genéticamente idénticos), autólogo (donde el donante es el propio receptor) y xenogénico (entre individuos de distintas especies)<sup>(1)</sup>.

A pesar de la frecuencia con la cual se realizan trasplantes en la actualidad nos preguntamos: ¿estamos aprovechando al máximo todo el potencial derivado de la transferencia de tejidos sanos a un enfermo?, ¿hemos logrado descifrar en su totalidad los mecanismos inmunológicos que derivan de un procedimiento “no natural”, del cual se benefician tantos pacientes?

La historia de los trasplantes se remonta a 1908 con innumerables procedimientos fallidos en animales y humanos a lo largo de la historia. Más tarde, Thomas y colaboradores<sup>(2)</sup>, realizaron los trabajos pioneros en Seattle, mostrando una “supervivencia libre de enfermedad” prolongada, en un notable número de pacientes, incluso aquellos con recaídas de leucemias avanzadas o múltiples transfusiones por anemia aplásica; es entonces cuando los trasplantes fueron aplicados al inicio o tempranamente en varias enfermedades, más que en pacientes con estadio avanzado, con un mejor resultado<sup>(3)</sup>.

A partir de entonces, el trasplante (particularmente el de células madres hematopoyéticas) evolucionó rápidamente desde “aceptable” hacia “terapia de primera línea para ciertas enfermedades”<sup>(3)</sup>. De hecho, sus indicaciones varían desde enfermedades hematológicas malignas, como la leucemia mieloide crónica, el mieloma múltiple, los linfomas, el neuroblastoma; neoplasias que no responden a tratamiento convencional; enfermedades hereditarias o adquiridas como la anemia aplásica, anemia de Fanconi, talasemia mayor, inmunodeficiencias celulares como las combinadas

severas; terapia génica (sustitución de un gen ausente o defectuoso por uno normal); hasta se discute la posibilidad que la Médula ósea (M.O) tenga la capacidad (a partir de algunas células troncales) de diferenciarse en tejidos no hematopoyéticos<sup>(1,3)</sup>.

A nivel mundial y en Venezuela se realizan actualmente trasplantes de células madres hematopoyéticas, no solo con las obtenidas de M.O, sino también desde sangre periférica y de cordón umbilical<sup>(4)</sup>.

Esta evolución ha ido paralela a la descripción del sistema HLA (Antígeno Leucocitario Humano), al desarrollo de sistemas de soporte o cuidados intensivos, al desarrollo de antibióticos de amplio espectro, a la nutrición parenteral, a la terapia de transfusión plaquetaria y al desarrollo de tratamiento inmunosupresor, radioterapia, inmunoglobulinas y hasta anticuerpos monoclonales, así como al mayor entendimiento de sus aspectos inmunológicos y de complicaciones, particularmente de la enfermedad de injerto contra huésped y el rechazo al injerto<sup>(3)</sup>.

El propio injerto de M.O es una forma de transferencia adoptiva, donde la “Inmunomodulación del injerto” puede ser clínicamente significativa, como es el caso de la “Reacción de Injerto contra la Enfermedad”<sup>(3)</sup>.

Sin embargo, ocurren con alta incidencia una serie de complicaciones como la reacción de injerto contra huésped, el severo estado de inmunodeficiencia secundaria a los tratamientos, el rechazo al injerto, e inclusive las recaídas (50% de los casos), por lo que es imperativo una adecuada selección de donantes para los receptores<sup>(5)</sup>, ya que uno de los principales obstáculos contra el trasplante de tejidos es nuestro propio sistema inmunológico, capaz de producir mecanismos responsables del rechazo de los injertos provenientes de cualquier ser vivo que no sea “idéntico” desde el punto de vista genético al receptor<sup>1)</sup>. Además, antes de la recepción del injerto por parte del paciente, se debe realizar el acondicionamiento o preparación del receptor con regímenes de inmunosupresión intensa, ya sea con

radiación y/o combinaciones de fármacos inmunosupresores, protocolos que pueden variar en las distintas unidades de trasplantes. Algunos utilizan como tratamiento profiláctico o terapéutico las transfusiones sanguíneas y plaquetarias, descontaminación intestinal, antibióticos de amplio espectro (especialmente en pacientes con fiebre), Anfotericina B (si la fiebre no mejora con lo anterior), Inmunoglobulina anti Citomegalovirus (CMV), nutrición parenteral, y finalmente, previendo la reacción de injerto contra huésped, combinaciones de prednisona, ciclosporina, metotrexate y otros. También se han usado azatioprina, radiación linfóide total, micofenolato mofetil, rapamicina, anticuerpo monoclonal anti CD3, anticuerpos antirreceptor de IL-2 (Anti CD25), CTLA-4 Ig, anti ligando de CD40, antivirales profilácticos contra CMV y Virus de Epstein Barr (VEB) e incluso contra Virus de Papiloma humano (VPH) (para intentar prevenir el carcinoma epidermoide cutáneo)<sup>(4,6)</sup>. Incluso en algunos pacientes se dificulta su capacidad de regenerar un repertorio completo de linfocitos nuevos, depletando sus linfocitos de memoria y sus células plasmáticas de larga vida, pudiendo tardar mucho tiempo en regenerar estas poblaciones<sup>(6)</sup>.

En nuestro país, según estadísticas de la Organización Nacional de Trasplantes de Venezuela (ONTV) registradas en la sección de Inmunogenética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela se han realizado desde el año 1987 hasta Diciembre del 2010 un total de 632 Trasplantes de células madres hematopoyéticas, de los cuales 383 corresponden a la Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera (CHET) en el periodo comprendido de 1987 a Diciembre 2010 distribuidos de la siguiente manera<sup>(7)</sup> (Tabla N°1):

**Tabla N° 1. Trasplantes realizados en la Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera (CHET) entre 1987 y 2010.**

<b>Autólogos</b>	204
<b>Alogénicos</b>	<b>173</b>
<b>Cordón Umbilical</b>	6
<b>Total</b>	<b>383</b>

Además, 249 trasplantes de células madres se han realizado en el Hospital de Clínicas Caracas (HCC) en el período comprendido del año 2000 al 2010 distribuidos de la siguiente manera<sup>(7)</sup> (Tabla N°2):

**Tabla N° 2. Trasplantes realizados en el Hospital de Clínicas Caracas entre 2000 y 2010.**

<b>Autólogos</b>	135
<b>Alogénicos</b>	<b>113</b>
<b>Cordón Umbilical</b>	1
<b>Total</b>	<b>249</b>

y se han realizado 66 trasplantes de células madres por el Programa de cooperación PDVSA-Fundación de Trasplante de M.O Italia, en el período comprendido del 2007 al 2010, distribuidos de la siguiente manera<sup>(7)</sup> (Tabla N°3):

**Tabla N° 3. Trasplantes realizados en por el Programa de cooperación PDVSA-Fundación de Trasplante de M.O Italia entre 2007 y 2010.**

<b>Autólogos</b>	3
<b>Alogénicos relacionados</b>	<b>46</b>
<b>Alogénicos no relacionados</b>	16
<b>Singénico</b>	1
<b>Total</b>	<b>66</b>

Estos trasplantes de células madres han sido realizados para distintas enfermedades onco-hematológicas; por ejemplo en el HCC se evidencia una media anual de 25 trasplantes aplicados a pacientes con distintas enfermedades hematológicas malignas, como leucemia linfocítica aguda o LLA, leucemia mieloide crónica o LMC, leucemia mieloide aguda o LMA , leucemia linfoblástica aguda , linfoma de Hodgkin o LH, linfoma no Hodgkin o LNH, anemia aplásica , enfermedad granulocítica crónica, agranulocitosis congénita, aplasia medular y anemia drepanocítica<sup>(7)</sup> .

En nuestro país los trasplantes de células madres hematopoyéticas se realizan solo entre hermanos HLA idénticos.

La experiencia clínica ha mostrado que de todos los locus clase I y II, los que tienen importancia en cuanto a predicción de resultados finales son: HLA-A, HLA-B y HLA-DR; el HLA-C no es tan polimorfo como el HLA- A y el HLA-B, mientras que HLA-DR y DQ se encuentran en un importante desequilibrio de ligamiento, de manera que cuando el locus DR es compatible, también lo suele ser DQ<sup>(6,8)</sup> .

A pesar del gran avance y desarrollo de este campo de la medicina, y del empleo de nuevas técnicas quirúrgicas que permiten la fácil reimplantación de órganos y tejidos así como su extracción, son muchos los obstáculos que aún quedan por saldar: los diferentes grados de “compatibilidad genética” entre donante y receptor, que determinan en gran parte el desarrollo de los cuatro principales fenómenos posteriores al trasplante, como son: la reacción de injerto contra huésped, el rechazo al injerto y la inmunodeficiencia asociada, además de la recaída<sup>(1,6,8)</sup> .

Sin embargo, aún cuando se evalúen los loci del HLA en el donante y receptor y se realice inmunosupresión intensa, la reacción de injerto contra huésped se produce con una incidencia del 26-76% (35-80%<sup>(8)</sup>), con una media del 30%, y una morbimortalidad del 50%<sup>(3)</sup> . En ésta, desempeñan papel importante los antígenos menores de histocompatibilidad<sup>(6)</sup> (responsables de una incidencia del

30-50% de injerto contra huésped<sup>(8)</sup>). La respuesta del injerto también puede conducir a la reacción de injerto contra “Enfermedad” (la cual es deseable)<sup>(6)</sup>. Pero particularmente en la reacción de injerto contra huésped puede ocurrir una reacción aguda, que se ha definido de forma arbitraria: se produce en los primeros 100 días post-trasplante<sup>(1,6,8)</sup> (con una incidencia de 35-80%, con una mortalidad de 10-20%<sup>(8)</sup>) y se asocia a disfunción en piel, intestino y/o hígado, erupción cutánea, ictericia, diarrea, hemorragia digestiva o incluso la muerte; o a una reacción crónica, que ocurre luego de los 100 días del trasplante en 25% de los pacientes<sup>(8)</sup>, similar a los síndromes o fenómenos autoinmunes, con fibrosis o atrofia de órganos afectados, como el pulmón. En ocasiones puede conducir a la muerte del paciente<sup>(6)</sup>.

Lo anterior se asocia al rechazo del injerto. Aunque se conocen en parte los mecanismos del rechazo de células de la M.O, se ha descrito que una de las principales dianas del rechazo al injerto son las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I y II del aloinjerto. Existen algunos elementos aun desconocidos, como células y citoquinas correspondientes a la inmunidad adaptativa y los linfocitos Natural Killer, o asesinos naturales (NK) (Inmunidad Innata) que pueden contribuir al rechazo de células troncales hematopoyéticas de M.O, pero sin atacar otros tejidos<sup>(9)</sup>. Por lo cual, la intervención de NK se ha estudiado en animales de experimentación y en humanos, cobrando cada vez más importancia como tema de investigación.

Por ello, diversos grupos de investigación se enfocan actualmente en determinar nuevas técnicas que aumenten la “compatibilidad genética” o inclusive cierto grado de “Incompatibilidad” entre receptores y donantes, por lo que existe un creciente interés por determinar el rol que juega la célula NK alorreactiva en la inmunoterapia adoptiva y la regulación de la activación celular mediada por los Receptores tipo Inmunoglobulina de NK (KIR) y sus ligandos las Moléculas HLA clase I (HLA-I) en el trasplante hematopoyético alogénico<sup>(4)</sup>, como componente de la inmunidad innata.

Existe una discusión actual a nivel mundial acerca de la alorreactividad de la célula NK del donante contra el receptor. Se cree que ésto puede mejorar el resultado de los trasplantes entre individuos HLA idénticos para controlar la recaída en la leucemia sin causar reacción de injerto contra huésped<sup>(5)</sup>; por lo que descifrar el rol de la alorreactividad de la célula NK sería una esperanza que podría ofrecer una mejoría dramática al resultado del transplante<sup>(5)</sup>. Se ha descrito que las células NK “alorreactivas” contribuyen de manera importante a eliminar los blastos de leucemia que escaparon al régimen de preparación y a la depuración de las células dendríticas y células T residuales (previniendo la enfermedad de injerto contra huésped y el rechazo, respectivamente)<sup>(10)</sup>.

### **Marco Teórico:**

Las células NK son una subpoblación de linfocitos que actúan como componente esencial de la respuesta inmune innata. Representan entre el 5-25% de los linfocitos en sangre periférica (descrito 10-15% por otros autores o 100-600 cel/μl aproximadamente<sup>(9,11,12)</sup>). Son identificadas por la expresión de CD56+, CD16+ y ausencia de CD3<sup>(11)</sup>.

La actividad de la célula NK es complementaria a la de la célula T citotóxica. Aunque al principio la hipótesis de la “pérdida de lo propio” expresaba que la regulación en baja de la molécula CMH-I desencadenaba la destrucción de la célula blanco por parte de NK citotóxica, recientemente se aceptó que la citotoxicidad de la célula NK depende de un equilibrio entre señales activadoras e inhibidoras<sup>(13)</sup> mediadas por sus correspondientes receptores en NK.

La mayoría del conocimiento acerca de los receptores de NK deriva de una de dos clases de moléculas distintas estructuralmente, las moléculas tipo “Lectina C” o las moléculas tipo “Inmunoglobulina”, dependiendo de la característica de sus dominios extracelulares. Ambas clases

consisten en moléculas activadoras e inhibidoras, lo cual está determinado por la secuencia de sus dominios intracelulares<sup>(14)</sup>.

Las células NK expresan una variedad de receptores activadores e inhibidores (Tabla N°4):

<b>Tabla N° 4 <sup>(14)</sup>. Ejemplos de Receptores de Células Citotóxicas Naturales Humanas (Modificado)</b>			
<b>Receptores</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Región extracelular</b>	<b>Ligando</b>
<b><u>Activadores:</u></b>			
<b>CD16</b>	1q23	Tipo Ig	IgG
<b>NKp44</b>	6p21	Tipo Ig	Hemagl. Influenza
<b>NKp30</b>	6p21	Tipo Ig	Desconocido
<b>NKp46</b>	19q13	Tipo Ig	Hemagl. Influenza
<b>KIR2DS1-2,2DS4</b>	19q13	Tipo Ig	Alotipos HLA-I
<b>NKG2D</b>	12p12	Lectina tipo C	MICA,MICB,ULPs
<b>CD94/NKG2C</b>	12p12	Lectina tipo C	HLA-E
<b><u>Inhibidores:</u></b>			
<b>KIR2DL1-3,3DL1-2</b>	19q13	Tipo Ig	Alotipos HLA-I
<b>CD94/NK2A</b>	12p12	Lectina tipo C	HLA-E
<b>LILRB1</b>	19q13	Tipo Ig	HLA-I
<b>LAIR1,LAIR2</b>	19q13	Tipo Ig	Desconocido

Sin embargo, estos receptores que pertenecen a diferentes familias pueden dividirse en:

**- Lectinas tipo C (CD94/NKG2) <sup>(15,16)</sup>:**

Con polimorfismos limitados. Localizadas en el cromosoma 12q1.3–13.4. La molécula humana CD94/NKG2 se une a la molécula no clásica HLA-E cargada con péptidos principales de otras moléculas HLA clase I. Además, las moléculas CD94/NKG2 pueden monitorizar niveles elevados de HLA I en la superficie celular.

**- Superfamilia de Receptores tipo Inmunoglobulina <sup>(15,16)</sup>:**

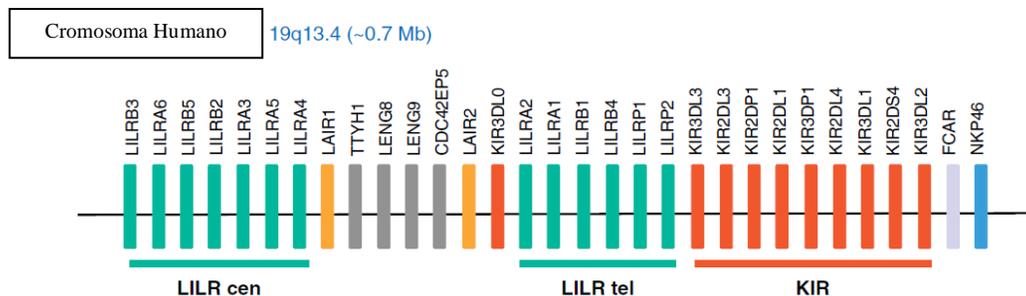
**-LILR (LIR, ILT):** Expresados en NK y en subclases de células T. Algunos LILR tienen una gran reactividad contra todas las moléculas HLA clase I y también pueden monitorizar niveles elevados de HLA I en la superficie celular. Localizados en el cromosoma 19q13.

### -KIR (receptor tipo inmunoglobulina de NK):

La principal característica de los receptores tipo inmunoglobulina de NK (KIR) que los distingue de los otros receptores de NK es su naturaleza altamente variable y su expresión clonal estocástica<sup>(5,14)</sup>: genomas individuales difieren marcadamente en el contenido de genes KIR, genes individuales muestran variabilidad alélica, y cada clona de células NK expresa solo ciertas combinaciones de moléculas KIR<sup>(14)</sup>.

La ubicación genómica de KIR es una región de aproximadamente de 150 kb dentro de un complejo de receptores leucocitarios (LCR) en el cromosoma humano 19q13.4<sup>(14)</sup> (Gráfico N°1) conteniendo 14 genes KIR y 2 pseudogenes<sup>(11)</sup>.

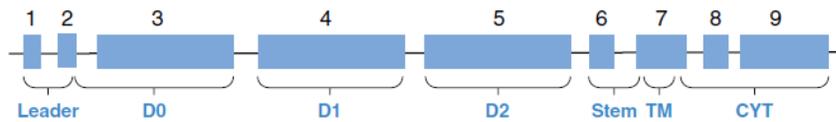
**Gráfico N°1** <sup>(14)</sup>. Ubicación genómica de KIR. Los genes KIR están ubicados en el Complejo de Receptores de leucocitos (CRL) en el Cromosoma 19q13.4. En el CRL se incluyen genes que codifican LILRs, LAIRs, FCAR y NKp46. El grupo en color gris tiene función desconocida. KIR3DL0 se encuentra fuera del grupo CRL. (Modificado)



El contenido de los genes KIR puede variar entre individuos, y hasta la fecha hay más de una docena de genes KIR descritos. Los genes KIR muestran fuertes similitudes entre uno y otro, y son derivados de un gen ancestral por una serie de duplicaciones, recombinaciones y mutaciones. Recientemente se ha descrito un nuevo gen relacionado a KIR, 3DL0 localizado en el complejo de receptores de leucocitos (LCR), pero por fuera del grupo de KIR<sup>(14)</sup>.

La estructura básica de los genes KIR (Gráfico N°2) comprende una unidad de 9 exones, que representa la organización de un gen ancestral<sup>(11, 14)</sup>. La organización exón-intron se correlaciona con sus dominios funcionales, por ejemplo, los exones 1 y 2 codificarían al segmento líder, los exones 3, 4 y 5 codificarían a los dominios extracelulares D0, D1 y D2 respectivamente, los exones 6 y 7 codifican regiones transmembranas del receptor y los exones 8 y 9 codificarían los dominios intracitoplasmáticos inhibidores o activadores según la secuencia de sus aminoácidos<sup>(14)</sup>.

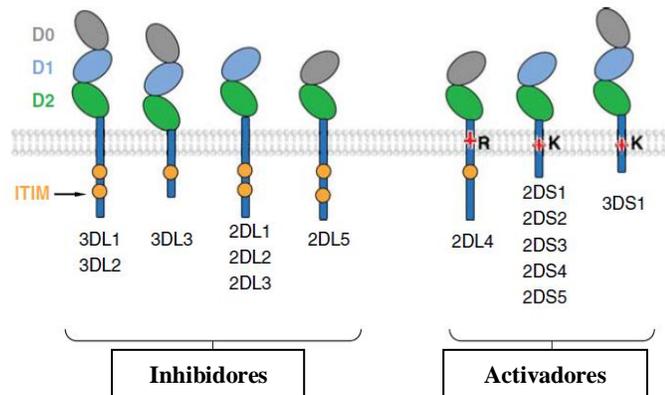
**Gráfico N° 2**<sup>(14)</sup>. Estructura básica de KIR: 9 exones del gen KIR ancestral. La organización exón-intron se correlaciona con los dominios funcionales. (Modificado)



Los genes KIR son altamente homólogos, a pesar de lo cual los genes KIR y sus alelos codifican proteínas que tienen diversas características en términos de unión a ligando, expresión en la superficie celular, señalización intracelular, y plegamiento proteico. Sin embargo, la diversidad en las secuencias nucleotídicas en las regiones regulatorias afectan la capacidad transcripcional de algunos de estos genes y sus alelos<sup>(14)</sup>.

La nomenclatura convencional para KIRs está basada en las características estructurales de sus dominios extracelulares (2D o 3D que reflejan el número de dominios tipo inmunoglobulina), región transmembrana (TM) y región intracitoplasmática o CYT (L o S, para los largos y cortos respectivamente) (Grafico 3). Además, la letra *p* denota pseudogenes putativos<sup>(11,14)</sup>.

**Gráfico N°3** <sup>(14)</sup>. Organización de los dominios de KIR: Dominios tipo Ig D0, D1 y D2 en color gris, azul y verde, respectivamente. KIR inhibitorio y 2DL4 tienen inmunorreceptores inhibitorios basados en motivos de tirosina en sus dominios intracitoplasmáticos, y los KIR activadores poseen un aminoácido básico en su dominio transmembrana. (Modificado)



Similitudes entre las secuencias y estructuras a través de las distintas moléculas KIR definieron 3 tipos de dominios tipo-Ig en KIRs, llamados D0, D1 y D2. Todas las moléculas KIR3D tienen la configuración D0, D1, D2 (desde N hasta C terminal). Las moléculas KIR2D tienen la configuración D1 y D2 (tipo I) o D0, D2 (tipo II)<sup>(14)</sup>.

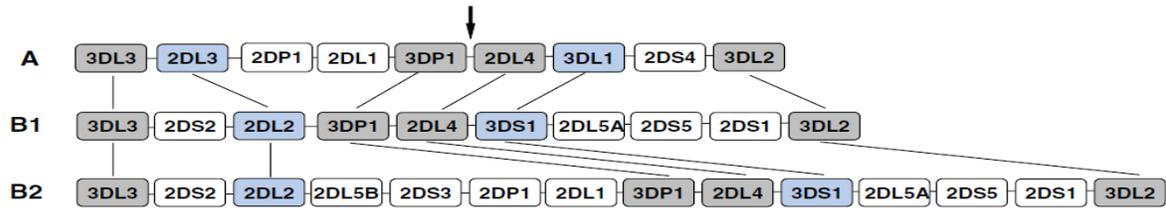
Las porciones intracitoplasmática (CYT) y transmembrana (TM) de las moléculas KIR predicen su actividad funcional: los KIR con tallo largo intracitoplasmáticos son inhibitorios (a excepción de 2DL4) mientras que los KIR con tallo intracitoplasmáticos corto, son activadores. Los KIR con colas citoplásmicas largas presentan uno o dos inmunorreceptores con motivos inhibitorios basados en tirosina (ITIM), que media señales inhibitorias. Los KIR de tallo corto carecen de los dominios ITIMs, y por el contrario, poseen un aminoácido cargado positivamente en su dominio TM, el cual conduce a la asociación con una molécula adaptadora, DAP-12, liberando señales activadoras a través de su motivo activador basado en tirosina (ITAM). KIR2DL4 (Solo se expresa en NKCD56+high<sup>(16)</sup>) tiene una estructura única debido a la combinación de un aminoácido cargado positivamente en el dominio TM y un motivo ITIM en la cola (tallo largo) CYT, se asocia con la proteína accesoria FcεRI-γ, que envía una “señal activadora” a la célula, vía su ITAM similar a Dap-12<sup>(11,14,16)</sup>.

Un aspecto muy importante en el contenido genético de los KIR es su variación. Los genes KIR individualmente son altamente polimórficos, superados solo por los genes del HLA<sup>(5)</sup>. A pesar de esta extrema variedad existen características sistemáticas en la organización del complejo KIR<sup>(14)</sup>. Cuatro genes KIR: 3DL3, 3DP1, 2DL4 y 3DL2, están virtualmente presentes en todos los haplotipos y se han denominado loci de armazón o marco. Los grupos básicos de haplotipos se distinguen basados en su contenido genético: Haplotipo A y B<sup>(14)</sup> (Gráfico N° 4).

El haplotipo A contiene 9 genes KIR, los cuales son uniformes en términos del contenido génico (3DL3, 2DL3, 2DL1, 2DP1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 2DS4 y 3DL2), es decir, tiene 5 genes inhibitorios (2DL1, 2DL3, 3DL1, 3DL2, 3DL3), 1 gen activador (2DS4), y 2 pseudogenes (2DP1, 3DP1) y uno al cual se le han descrito tanto funciones inhibitoras como activadoras (2DL4)<sup>(5,13,14)</sup>. El haplotipo B exhibe extremada diversidad tanto en términos de contenido génico y polimorfismo alélico (se han descrito más de 20 haplotipos B). Estos haplotipos contienen varias combinaciones de genes KIR y gran cantidad de genes activadores KIR<sup>(14)</sup>.

KIR2DL2 y 2DL3 se segregan como alelos de un mismo loci, igual que 3DS1 y 3DL1. Casi todos los haplotipos contienen estos 2 loci, así que virtualmente todos los individuos tienen 2DL2 y/o 2DL3, y 3DL1 y/o 3DS1 dentro de su repertorio KIRs. Así que estos 2 loci pueden ser considerados como loci de marcos adicionales, en conjunto con 3DL3, 3DP1, 2DL4 y 3DL2<sup>(14)</sup>.

**Grafico N°4** <sup>(14)</sup>. Secuencia genómica de haplotipos KIR., Se muestra un haplotipo del grupo A y dos del grupo B. Los 4 genes de marco están en gris. El 2DL2/2DL3 y 3DL1/3DS1 están presentes en casi todos los haplotipos (en azul). La flecha indica el área con recombinación simétrica frecuente entre centrómero y telómero. (Modificado)



Se han reportado muchos haplotipos inusuales, incluyendo haplotipos truncados que pierden algunos genes del marco o haplotipos alargados que contienen genes duplicados. En ambos, se han implicado recombinaciones de alelos no homólogos durante la evolución de los locus<sup>(14)</sup>.

Los haplotipos A y el B están distribuidos casi de forma igual en caucásicos, pero en japoneses, chinos y coreanos el haplotipo A es más frecuente (aproximadamente 75%). En contraste, aborígenes australianos tienen muy baja frecuencia de haplotipos A. La gran variabilidad en la estructura de los haplotipos ha permitido obtener más de 100 perfiles KIR individuales observados a través de la data de varias poblaciones. Así que la plasticidad física del locus KIR ha conducido a una forma rápida de selección natural resultando en la prevalencia de haplotipos “inhibidores” (A) en una población y “activadores” (B) en otras<sup>(14)</sup>.

En Venezuela, se han reportado 2 estudios de genotipificación de KIR, el primero realizado en población aborigen por Layrisse y colaboradores<sup>(17)</sup>, y el segundo en población mestiza por Conesa y colaboradores<sup>(18)</sup>. En este último se estudiaron 205 individuos sanos mestizos venezolanos, no relacionados, identificando 45 genotipos KIR diferentes basados en el perfil numérico de KIR del Sistema de Yawata y colaboradores<sup>(19)</sup>. Se reporta además que los genes KIR 2DL4, 3DL2, 3DL3 y el pseudogen 3DP1 están presentes en todos los individuos. Los KIR inhibitorios presentaron una

frecuencia mayor de 0,69 (excepto para 2DL2 y 2DL5 con 0,29 y 0,37, respectivamente); mientras que los activadores 2DS1, 2DS2, 2DS5 y 3DS1 mostraron baja frecuencia con rangos de 0,23 a 0,29. El KIR2DS3 presentó menor frecuencia aún (0,11), mientras que 2DS4 fue el único activador con alta frecuencia (0,68). El genotipo 1, el cual representa a individuos homocigotos para haplotipo A, fue el más frecuentemente observado (25,9%) similar a lo observado en población caucásica, seguido del genotipo 4 (13,7%) y el genotipo 2 (11,2%)<sup>(18)</sup>.

En cuanto a los ligandos de KIR, solo las moléculas HLA clase I han sido ampliamente identificadas<sup>(14)</sup> (Tabla N° 5).

**Tabla N° 5** <sup>(20)</sup>. Moléculas KIR y sus ligandos HLA (Modificado)

<b>KIR</b>	<b>Ligando</b>	<b>Señalización</b>	<b>Función</b>
<b>2DL1</b>	HLA-C2 <sup>Ly/80</sup>	ITIM	Inhibición
<b>2DS1</b>	HLA-C2 <sup>Ly/80debil</sup>	DAP12	Activación
<b>2DL2</b>	HLA-C1 <sup>Asn/80</sup>	ITIM	Inhibición
<b>2DL3</b>	HLA-C1 <sup>Asn/80</sup>	ITIM	Inhibición
<b>2DS2</b>	HLA-C1 <sup>Asn/80debil</sup>	DAP12	Activación
<b>2DL4</b>	HLA-G	?	Activación
<b>2DL5</b>	?	ITIM	Inhibición
<b>2DS3</b>	?	DAP12	Activación
<b>2DS4</b>	?	DAP12	Activación
<b>2DS5</b>	?	DAP12	Activación
<b>3DL1</b>	HLA-Bw4	ITIM	Inhibición
<b>3DS1</b>	?	DAP12	Activación
<b>3DL2</b>	HLA-A <sup>débil</sup>	ITIM	Inhibición
<b>3DL3</b>	?	ITIM	Inhibición

Los KIR inhibitorios 2DL2/3 y 2DL1 reconocen dos alotipos de grupos HLA-C mutuamente excluyente, el grupo 1 (Ej. HLA-C\*01,\*03,\*07,\*08,\*12) y el grupo 2 (Ej. HLA-

C\*02,\*04,\*05,\*06,\*15,\*16,\*17,\*18) respectivamente. Existe una jerarquización en las interacciones de KIR y HLA-C, en la cual 2DL1-C2 es fuerte y 2DL3-C1 es débil<sup>(14,20)</sup>.

El KIR inhibidor 3DL1 es el receptor para los alotipos de HLA-B con motivos Bw4 en las posiciones 77-83, y puede ser dividido en 2 grupos alternativos, HLA-Bw4 y HLA-Bw6. Recientes reportes redefinieron el entendimiento del reconocimiento de KIR3DL1. Este reconoce los alelos de HLA-Bw4, excepto para 1301 y 1302, y algunos alelos HLA, llamados 2301, 2402 y 3201<sup>(5)</sup>. No se han encontrado KIRs que se unan a alotipos HLA-Bw6 con alta afinidad, aunque la unión con baja afinidad a 3DL1 puede ocurrir<sup>(14)</sup>.

Es interesante que 3DL2 interactúe con alotipos HLA-A3 y A11 y en esta interacción se ha visto una fuerte selección de péptidos debido a que su unión fue detectada solo cuando un péptido específico de VEB fue usado en los plegamientos del tetramero de HLA<sup>(14)</sup>.

KIR2DL4 se ha mostrado unido a HLA-G, una molécula no clásica de clase I, con limitado polimorfismo. HLA-G es específicamente expresada en trofoblastos fetales, células endoteliales y córnea, y está regulada positivamente en algunas células tumorales y bajo condiciones de inflamación. 2DL4 tiene muchas características únicas: es un gen de marco que está transcrito en todas las clonas de células NK. Sin embargo, algunos alelos 2DL4 en humanos, los cuales tienen una frecuencia de combinación de cerca el 50%, codifican productos que no se expresan en la superficie celular, sugiriendo que este gen puede estar sujeto a un balance de selección<sup>(14)</sup>.

En cuanto a los KIR activadores, la baja afinidad de unión de los receptores activadores y sus ligandos HLA clase I puede estar relacionada al control de la autoagresión. Los receptores activadores 2DS1, 2DS2 y 3DS1 muestran altas similitudes en las secuencias de sus dominios extracelulares con las moléculas inhibitoras 2DL1, 2DL2/3, y la molécula 3DL1, respectivamente, aunque la unión de 2DS1 al alotipo HLA-C2 es sustancialmente más débil que su contraparte inhibitoria, 2DL1. La unión

de 2DS2 a HLA-C1 ha sido más difícil de demostrar. 2DS4, un KIR activador con un dominio extracelular distinto de cualquier otro KIR, interactúa específicamente con HLA-Cw4, pero no con HLA-Cw6 (ambos derivan de los alotipos del grupo HLA-C2)<sup>(14)</sup>.

La relevancia biológica de las interacciones de baja afinidad entre KIRs activadores y moléculas clase I no está clara. Estos receptores pueden existir en relación a KIRs inhibitorios atenuados en situaciones donde la inhibición puede no ser ventajosa. Alternativamente, y análogo a recientes estudios en ratones, los KIR activadores en las células NK que no poseen KIR inhibitorios que reconozcan lo propio, pueden ser agresivos en sitios de inflamación, confiriendo un efecto protector. Otra posibilidad es que los KIR activadores aparentemente se unen a moléculas que sirven como indicadores de anomalías en células propias, tales como proteínas inductoras de stress codificadas por el genoma del huésped o codificadas por patógenos, las cuales se expresan en la superficie de células infectadas. La mayoría de los ligandos identificados para los receptores activadores están estructuralmente relacionados a las moléculas clase I, incluyendo a las cadenas A y B del HLA clase I (MICA/B) inductoras de stress, la proteína de unión a UL16 (ULBPs), y a la proteína m157 del citomegalovirus en el ratón (MCMV). Sin embargo, ligandos no relacionados al HLA tales como las Hemaglutininas de Influenzae, han sido reportadas para los receptores activadores. Las señales activadoras pueden ser bloqueadas por señales inhibitorias mediadas por una selección de receptores que reconocen moléculas propias (HLA-I) ubicuas, expresadas “normalmente” bajo condiciones de salud, y así previenen a las células NK actuar contra ellas <sup>(14)</sup>. Futuros estudios podrán dilucidar las funciones específicas de KIR activadores, genes que sirven como principales contribuyentes a la variabilidad en los perfiles de KIR a lo largo de la población. Es de hacer notar que una proporción importante de humanos no posee ningún KIR activador en la superficie de las células NK (debido a la

presencia de variantes truncadas de 2DS4 y 2DL4 en los haplotipos A). Esto indica que una ausencia de los KIR activadores en el repertorio de células NK no origina un detrimento general<sup>(14)</sup>.

Debido al rol de KIR en las respuestas del sistema inmune, su especificidad para alotipos de HLA clase I y su extensa diversidad genómica, es concebible que la variación de los genes KIR afecte la resistencia y la susceptibilidad a la patogénesis de diferentes enfermedades, convirtiéndose en un blanco atractivo para estudios de asociación a enfermedad. Un creciente número de evidencias ilustran la influencia del polimorfismo de KIR en las enfermedades humanas y ha sido recientemente abordado en diversas revisiones<sup>(14)</sup> (Tabla N°6).

Las moléculas KIR activadoras, que estimulan la secreción de citoquinas por NK/CTL y la citólisis de la célula blanco, son generalmente beneficiosas en las respuestas a las enfermedades infecciosas y tumorales. Sin embargo, estos desórdenes tienen una variedad de etiologías y la activación inmune no necesariamente beneficia a todos los estadios de la enfermedad. Por ejemplo, genotipos KIR que confieren fuerte activación podrían aumentar el desarrollo de tumores conocidos como “los asociados a inflamación”, y éste es el caso del cáncer cervical. La data sugiere que los genotipos activadores se asocian a incremento del riesgo de cáncer cervical, quizás como consecuencia de la respuesta inmune vigorosa crónica contra la infección por VPH, mediada en parte por interacciones KIR-HLA<sup>(14)</sup>.

Tabla N°6 <sup>(14)</sup>. Resumen de KIR/HLA asociado a enfermedad (Modificado)

Enfermedad	Asociación	Efecto
<b><u>Autoinmunidad/Inflamatoria:</u></b>		
Artritis psoriatica	2DS1/2DS2, HLA-Cw homocigoto	Susceptibilidad
Psoriasis vulgar	2DS1-HLA-Cw06,2DS5, Haplotipo B	Susceptibilidad
Psoriasis guttata	Débil asociación a 2DS1	Susceptibilidad
Vasculitis reumatoide	2DS2/HLA-Cw03	Susceptibilidad
Escleroderma	2DS2+/KIR2DL2	Susceptibilidad
Enf. Behcet	Expresión anormal de 3DL1	Asoc. a Enf.severa ocular
Espondiloartritis	Mayor expresión de 3DL2	Puede contribuir a patogénesis de Enf.
<b><u>Infeccioso:</u></b>		
HIV-1	3DS1/HLA-Bw480I B*57	Lenta progresión
VHC	2DL3/HLA-C1 homocigoto 3DS1/HLA Bw4 3DS1/HLA-Bw480I	Resolución de la infección Resolución de infección Protección para Hepatocarcinoma
Reactivación de CMV post-trasplante M.O	>1 KIR activador en donante	Riesgo reducido de reactivación
<b><u>Cáncer:</u></b>		
Melanoma maligno	2DL2/2DL3;HLA-C1	Susceptibilidad
Leucemia	2DL2 KIR AB1 y AB9	Susceptibilidad
Cáncer cervical	Genotipo 10 2DL5*002	Susceptibilidad
Enf. Linfoproliferativa linfocitos granulares	Expresión anormal de KIR Incompatibilidad KIR/HLA I	Puede contribuir a patogénesis de enfermedad
<b><u>Desordenes</u></b>		
<b><u>Uterinos/Reproductivos:</u></b>		
Preeclampsia	Madre genotipo KIR AA-feto HLA C2	Susceptibilidad
Aborto espontaneo recurrente	Madre con < KIR inhibitorio	Susceptibilidad
Endometriosis pélvica	Expresión anormal KIR	Puede contribuir a patogénesis de enfermedad

En estudios de asociación de KIR/HLA se ha descrito mayor susceptibilidad a leucemias en pacientes con presencia de 2DL2<sup>(12,21)</sup>. Así mismo se ha encontrado menor frecuencia de KIR2DS3 y 2DL5 en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica, en la cual se describe menor incidencia de 5 o 6 KIR activadores y mayor frecuencia de KIR inhibidores, además de mayor supervivencia de pacientes con KIR3DS1 asociado a HLA Bw4 y menor supervivencia libre de eventos en pacientes con HLA C2 en ausencia de KIR2DS1<sup>(22)</sup>. En pacientes con Leucemia mieloide aguda se ha observado menor frecuencia de 2DS3, además de menos KIR activadores y más inhibidores<sup>(23)</sup>.

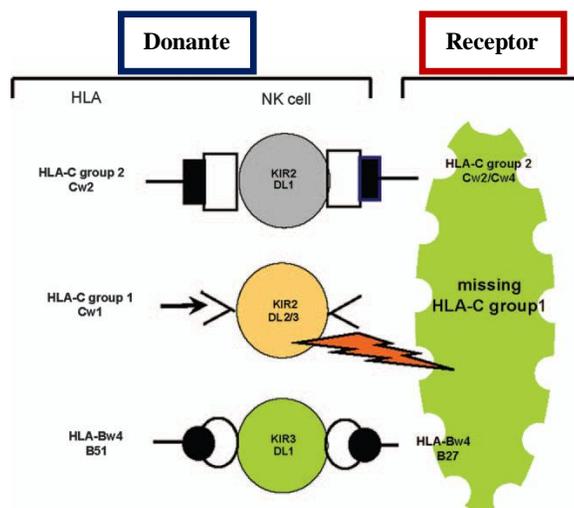
Debido a la gran variabilidad de los locus KIR y a sus efectos en una variedad de enfermedades, podrían servir como agentes terapéuticos en enfermedades que directa o indirectamente involucren las respuestas del sistema inmune. De hecho, en el trasplante de células madres HLA compatible, las células NK tienen aparentemente efecto beneficioso en una variedad de leucemias<sup>(14)</sup>; muchos estudios han descrito genotipos compuestos de HLA/KIR asociados con susceptibilidades a ciertos cánceres (melanoma, leucemia, neoplasia cervical y linfoma de hodgkin)<sup>(12)</sup>. La alorreactividad de la célula NK del donante contra el receptor debido a incompatibilidad de receptores KIR inhibitorios de las células del donante y sus ligandos HLA clase I en las células del receptor, se han asociado no solo con una significativa reacción de injerto contra leucemia, sino además, al control del rechazo y de la reacción aguda de injerto contra huésped<sup>(14)</sup>. En un artículo de revisión acerca de KIR activadores e inhibidores en el trasplante de células madres haploidéntico para curar leucemias de alto riesgo los autores se formularon la siguiente pregunta: ¿Cómo los “precursores de células NK” de los donantes en un receptor incompatible podían convertirse en NK maduras alorreactivas y atacar células leucémicas? Una probable explicación planteada fue que en el trasplante haploidéntico la infusión de “megadosis de células CD34+” podría aportar un microambiente de M.O predominantemente del tipo

del donante, permitiendo la educación de NK similar a la que ocurre en el donante; además, a la siguiente pregunta formulada por los mismos autores sobre ¿Por qué la célula NK alorreactiva no causa reacción de injerto contra huésped *IN VIVO*? Se consideró sobre la base de estudios analizados en el artículo, que la célula NK ataca a células hematopoyéticas del huésped mientras que no lo hace contra otros tejidos, los cuales si son blancos comunes de células T, ya que la célula NK atacaría a diferentes tipos celulares solo bajo situación de stress celular como en la infección o la transformación tumoral<sup>(24)</sup>.

Así que la inmunoterapia adoptiva utilizando a células NK podría aportar una modalidad terapéutica posible en enfermedades infecciosas y malignas<sup>(14)</sup>.

En un estudio funcional citado por Velardi<sup>(5)</sup>, realizado en 112 pacientes con leucemias mieloides agudas de alto riesgo quienes recibieron trasplantes haploidénticos de donantes NK alorreactivos y no alorreactivos, el análisis detectó alorreactividad cuando las clonas NK fueron probadas o retadas con grupos HLA-C incompatibles, de blancos alogénicos. La frecuencia de la alorreactividad de las clonas fue alta, como 8+/- 6 células de 100 para el grupo 2 de HLA-C incompatible, y 5+/- 3 de 100 para el grupo 1 de HLA-C incompatible (Grafica N°5)<sup>(25)</sup>.

**Gráfica N° 5** <sup>(5)</sup> Alorreactividad de NK de donante contra receptor. Las alorreacciones de NK son generadas entre donantes y receptores incompatibles en los ligandos KIR en la dirección injerto contra huésped. NK del donante expresa receptores inhibitorios para HLA propios, como el HLA C del grupo 1, que está ausente en el receptor. Esta pérdida de expresión del propio ligando media alorreacción. En este ejemplo un donante con células NK expresa KIR2DL2/3, receptores inhibitorios para alelos HLA C grupo 1, no presentes en el receptor, lo cual activa la destrucción del blanco. **(Modificado).**



En el estudio previamente mencionado los pacientes con leucemia mieloide aguda de alto riesgo recibieron trasplante haploidéntico de donantes NK alorreactivos (51 pacientes) y NK no alorreactivos (61 pacientes). Los que recibieron trasplantes de donantes “NK alorreactivos” se asociaron a una significativa menor recaída con remisión completa (3% vs 47%.  $p < 0,003$ ), mejor supervivencia libre de eventos en pacientes trasplantados no solo en remisión (67% vs 18%.  $p = 0,02$ ) sino además, en recaídas (34% vs 6%.  $p = 0,04$ ), con un riesgo reducido de recaídas o muerte ( $p < 0,001$ )<sup>(25)</sup>.

Aunque es conocido que el gen del receptor del HLA-Bw4 (KIR3DL1) se encuentra en 90% aproximadamente de los individuos, se evidenció en el estudio previamente mencionado de Ruggeri y colaboradores<sup>(25)</sup> que al enfrentar clones de NK de individuos HLA-Bw4 positivo, quienes poseen el gen KIR3DL1, contra blancos alogénicos HLA-Bw4 negativos, se detectaban clones de NK alorreactivas en solo 2/3 de los individuos<sup>(25)</sup>. Las dificultades en detectar clones NK alorreactivas pueden deberse a sus frecuencias altamente variables o debido ciertamente a variantes alélicas

KIR3DL1 que no mantuvieron su expresión en la membrana celular<sup>(5)</sup>, como en efecto fue evidenciado en un estudio de Pando M y colaboradores<sup>(26)</sup> y en otro de Thomas R, Yamada E y colaboradores<sup>(27)</sup>.

La significancia funcional del polimorfismo de los genes KIR no se conoce aún, y la mayoría de los estudios acerca de la contribución de los genes KIR en la alorreactividad de la célula NK no distingue entre alelos de genes KIR individuales<sup>(13)</sup>.

Por ello se han propuestos diversas teorías, entre las que destaca la “Teoría del permiso de maduración” que propone que la unión de KIR inhibitorio con su correspondiente molécula clase I es necesario para adquirir funciones efectoras. Otra propone que la célula NK se vuelve funcionalmente anérgica, sin señales inhibitorias propias. Este “permiso” no está bien entendido, ya que la dificultad de un solo KIR inhibitorio para unirse a su ligando no es suficiente para producir el ataque de una NK, así que las señales activadoras en la superficie celular son necesarias. No han sido caracterizados aún un gran número de ligandos para las moléculas KIR activadoras<sup>(11)</sup>.

En el caso del “Transplante de Células Madre de Médula ósea alogénico”, las células NK del donante pueden atacar a células del receptor que no expresen ligandos HLA clase I apropiados para los receptores KIR inhibitorios del donante<sup>(13)</sup>. Es decir, en el contexto del transplante de células madre hematopoyéticas, particularmente en el transplante HLA compatible, las células NK del donante han mostrado en algunos estudios que influyen la repuesta o el resultado por un efecto directo anti-tumor, así como una reducción de enfermedad de injerto contra huésped y reducción en la incidencia del rechazo al injerto<sup>(11, 28)</sup>.

Luego del transplante de células madre de M.O las células NK son la primera subclase de linfocitos en regenerarse en sangre periférica<sup>(13)</sup>. Se ha descrito en estudios que la célula “NK alorreactiva” se ha encontrado hasta más de 4 meses post-trasplante en los receptores<sup>(29)</sup>. Algunos estudios han mostrado el efecto beneficioso de la alorreactividad de NK sobre la evolución del

trasplante de M.O, mientras que otros reportan tasas inferiores de recaída y reacción de injerto contra huésped. Sin embargo, algunos no observaron efectos sobre la evolución del trasplante<sup>(13)</sup>.

Estudios *in vitro* mostraron células NK alorreactivas contra células tumorales de linaje linfopoyético procedentes de pacientes con leucemia aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin y el mieloma múltiple, como se plantea en una revisión de Rugeri, Velardi y colaboradores<sup>(29)</sup>. Un blanco que no ha parecido susceptible han sido las células originadas en la leucemia linfocítica aguda común<sup>(5)</sup>; de hecho, se describe en algunos trabajos que el genotipo KIR del donante influencia la evolución del trasplante para Leucemia Mieloide Aguda pero no para Leucemia Linfocítica Aguda<sup>(30)</sup>.

Las células NK alorreactivas, además, mostraron citotoxicidad significativa contra melanoma y líneas celulares de carcinoma de células renales en un estudio en el cual las NK fueron enriquecidas y clonadas de la sangre de pacientes y donantes sanos, homocigotos para los alelos de HLA-C del grupo 1 o grupo 2, y se les evaluó su citotoxicidad *in vitro* contra líneas celulares linfoblásticas transformadas por Virus de Epstein Barr (VEB), carcinoma de células renales y melanoma, con o sin ligandos HLA-C para KIR inhibitorio<sup>(31)</sup>.

En el trasplante hematopoyético haploidéntico, con potencial de alorreactividad de células NK del donante contra el receptor, el injerto de células madres regenera el mismo repertorio del donante, incluyendo a las células alorreactivas del donante contra el receptor por más de 1 año<sup>(32)</sup>. Este rol crítico de la alorreactividad de NK fue demostrado en un modelo de ratones con Inmunodeficiencia combinada severa y diabético no obeso (NOD/SCDI), a los cuales se les infundió células humanas de leucemia mieloide aguda desarrollando leucemia de 5-6 semanas y muriendo luego de 3 semanas si no recibían tratamiento o cuando se realizaba infusión de clonas de células NK humanas “no

alorreactivas”; en contraste, una simple infusión de células “NK alorreactivas” erradicaba las células de leucemia humana en estos animales<sup>(32)</sup> .

El 67% de la probabilidad de supervivencia libre de eventos para los pacientes con leucemia mieloide aguda en remisión, trasplantados con donantes NK alorreactivos, es una de las mejores tasas de supervivencia después de un trasplante de donantes relacionados, a partir de sangre de cordón<sup>(13)</sup>.

Otro estudio mostró que la alorreactividad de la célula NK provee mucha mayor protección de las recaídas de leucemia cuando es ofrecido por donantes maternos (oponiéndose a cualquier otro donante con otra relación familiar al receptor), como se observó en un análisis de 118 pacientes trasplantados por leucemias agudas en 2 centros de salud y luego de 5 años se evidenció mejor supervivencia libre de eventos en los receptores de trasplantes cuyos donantes fueron sus madres al compararlas con sus padres ( $p < .001$ ). El efecto fue independiente y aditivo de los efectos beneficiosos de la alorreactividad de NK. La mejoría en el trasplante madre-hijo puede deberse a que el sistema inmune materno se expone a antígenos fetales durante el embarazo y a la subsiguiente inmunidad de la célula T de memoria contra el haplotipo HLA paterno del niño<sup>(33)</sup>. La resistencia *in vitro* a la muerte por NK alorreactiva del fenotipo leucemia linfocítica aguda común, fue similar a la falla del efecto antileucémico en pacientes adultos. Sin embargo, en la LLA de niños se reportó que el trasplante de donantes NK alorreactivos disminuyó el riesgo de recaídas<sup>(33)</sup>.

El Eurocord- Netcord y el grupo EBTM (European group for blood and marrow transplantation) que trabajó en leucemia aguda, accedió a la alorreactividad de la célula NK de la sangre procedente de cordones trasplantados en 218 pacientes con leucemias agudas y encontró que se asociaba a una significativa reducción en la incidencia de recaída ( $p= 0,05$ ) y mejor supervivencia libre de leucemia (73% vs 38%  $p = 0,0016$ ). Los beneficios fueron más marcados en leucemia mieloide aguda<sup>(34)</sup>.

El HLA-A3/A11 aparentemente funciona como ligando de KIR3DL2 solo cuando se une a péptidos del VEB<sup>(35)</sup>. Este fue uno de los resultados obtenidos en un estudio donde se realizó transfección de KIR3DL2\*001, ILT-2 y CD94/NKG2A a células Baf3, a las cuales se les monitorizó la expresión de los receptores KIR por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales: anti-KIR3DL2 (DX31), anti-ILT-2 y anti-CD94 (DX22)<sup>(35)</sup>.

Lo anterior ha sido discutido por diversos autores sugiriendo que futuros estudios tendrán que definir si la reactivación del VEB en post-trasplantes hace disponibles péptidos para la unión a A3/A11 y como consecuencia, conduce a la generación de células NK del donante específicas de A3/A11, las cuales sean alorreactivas contra receptores que no tengan A3 y/o A11<sup>(13)</sup>.

Resulta intrigante una característica comúnmente observada, que es la falla o pérdida de células T de memoria en el injerto (por depleción de células T haploidénticas o por las células T vírgenes predominantes en sangre de cordón) que aparentemente permiten la recuperación funcional total de NK, por lo que resulta interesante un estudio sobre las células mononucleares de sangre periférica de 77 parejas de donantes y receptores, estos últimos con leucemia mieloide crónica, comparando el trasplante repleto de células T vs depletado de células T, demostrando que las células T en el injerto afectan adversamente la reconstitución de KIR, la pérdida de NK y los resultados clínicos<sup>(36)</sup>.

Evidencias adicionales que la célula T antagoniza la reconstitución de NK con potencial alorreactivo deriva de muchos estudios de trasplantes de donantes no relacionados, usando injertos repletos de células T, como fue evidenciado en un análisis que incluyó 175 receptores de T.M.O de donantes no relacionados, quienes tenían tipificación de tejidos para HLA-A-B-C y DRB1 con por lo menos 1 alelo incompatible de clase I<sup>(37)</sup>; además, se describe en un caso clínico de la literatura como la depleción de células T del injerto parece favorecer la reconstitución y la alorreactividad de NK, tal como ocurrió en un paciente masculino de 21 años con Síndrome mielodisplásico (SMD) y

monosomía 7 (lo cual se considera de mal pronóstico) quien recibió trasplante de “células madres de sangre periférica” a partir de su tío y luego de 5 años no tenía actividad del SMD ni enfermedad de injerto contra huésped<sup>(38)</sup>.

Algunas investigaciones, como una previamente descrita<sup>(37)</sup> no mostraron ventajas en el trasplante de donantes incompatibles con ligandos KIR, otro ejemplo de ello fue un estudio de gran cohorte que incluyó 1498 pacientes que recibieron trasplantes de médula ósea no relacionado, en el que todos los injertos contenían células T, con HLA A-B y DR serológicamente compatible, con diferentes malignidades hematológicas como LMA, LLA, LMC, SMD y linfoma no Hodgkin<sup>(39)</sup>, mientras que unos pocos observaron incremento en el efecto del injerto contra la leucemia, como ocurrió en un estudio de 130 pacientes con leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y mielodisplasia<sup>(40)</sup>. En este estudio los receptores de trasplantes compatibles con ligandos de KIR recibieron Inmunoglobulina anti-timocito pre-trasplante, presentando *in vivo* depleción de células T, mostrando ventajas marcadas en la supervivencia<sup>(40)</sup>.

Las razones para los resultados contradictorios en diferentes estudios pueden incluir la heterogeneidad en los protocolos empleados para el trasplante, diferencias en los criterios de inclusión, los regímenes de preparación para el trasplante, el contenido del injerto, el grado de incompatibilidad HLA del donante y la inmunosupresión post-trasplante<sup>(13)</sup>. Por lo que la forma más óptima de utilizar esta alorreactividad de la célula NK está sujeta a un intenso debate<sup>(11)</sup>.

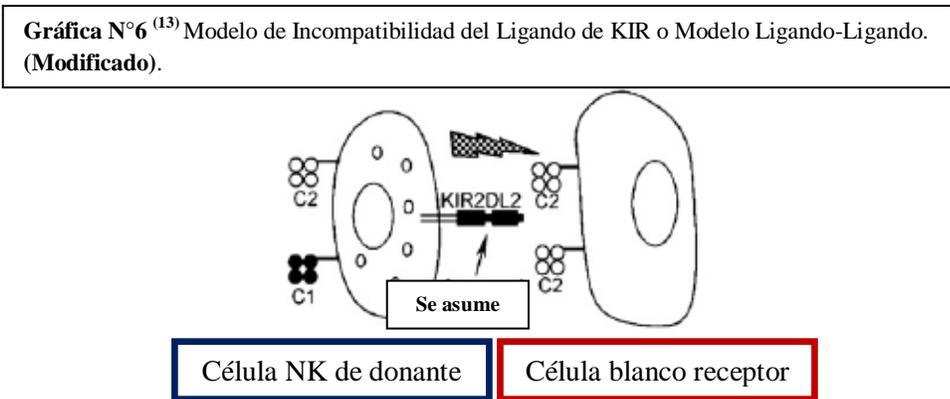
Han sido propuestos diferentes modelos de alorreactividad de la célula NK para predecir la evolución del trasplante de células madres hematopoyéticas<sup>(13)</sup>:

1. Modelo de Incompatibilidad del Ligando de KIR o Modelo Ligando-Ligando:

La incompatibilidad del ligando de KIR o modelo ligando-ligando predice la alorreactividad de la célula NK en la dirección injerto contra huésped, cuando el receptor no expresa un ligando KIR

inhibitorio, en este caso un miembro del grupo 1 del HLA-C que si está presente en el donante (Gráfica N° 6).

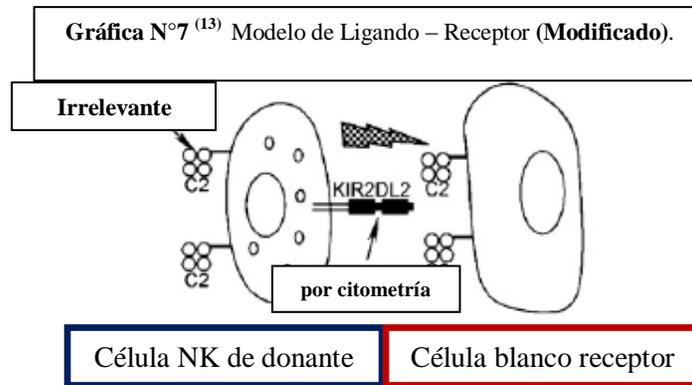
Este modelo asume la presencia en la célula NK funcional del donante la expresión de KIR2DL2 (Receptor de la molécula HLA-C del grupo 1) como receptor inhibitorio. El método requerido para determinarlo es la tipificación de HLA por alta resolución del donante y el receptor.



## 2. Modelo de Ligando-Receptor:

Predice la alorreactividad en la dirección injerto contra huésped cuando el receptor no tiene expresión de un ligando HLA para un KIR inhibitorio verificado del donante. El tipo de HLA en las células del donante no se toma en cuenta en este modelo (Gráfica N°7).

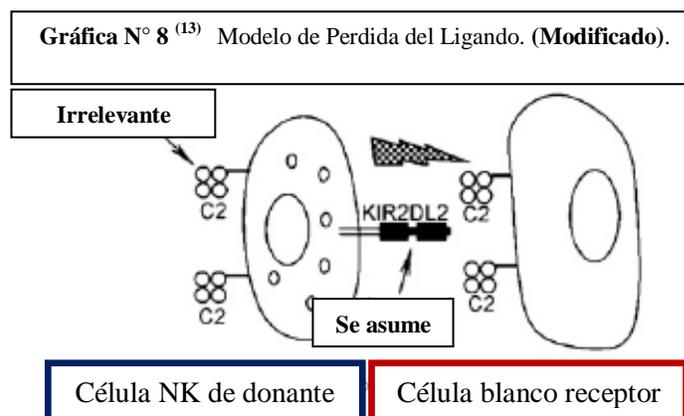
El método requerido para determinarlo es la tipificación de HLA por alta resolución al receptor (en este modelo el tipo HLA del donante no es considerado), genotipo KIR y fenotipo de la célula NK del donante.



### 3. Modelo de Pérdida del Ligando:

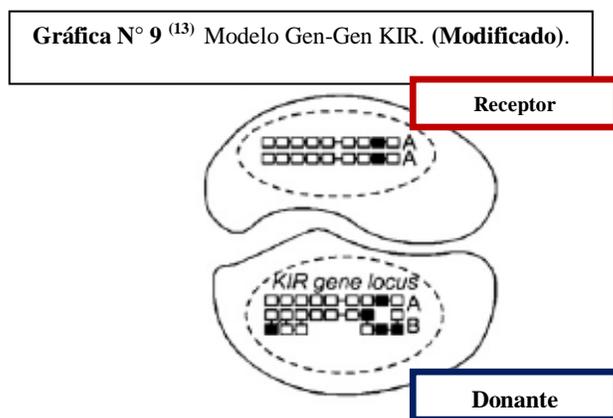
Este propone la alorreactividad de la célula NK en la dirección injerto contra huésped, cuando las células del receptor no expresan por lo menos uno de los ligandos de HLA (C1-C2 o Bw4) (Gráfica N°8). En este modelo se asume que la mayoría de la población tiene repertorios de KIR inhibitorios extensos y quien determina su activación es el Ligando ausente.

El método requerido para determinarlo es la tipificación de HLA por alta resolución al receptor (en este modelo no se considera el tipo HLA del donante)



#### 4. Modelo Gen-Gen KIR:

Predice la alorreactividad de NK cuando el donante y el receptor son incompatibles en sus genes KIR. Este modelo caracteriza los genes KIR, tanto del donante como del receptor, y la diferente expresión individual de genes inhibitorios y activadores entre el donante y el receptor de KIR no tiene ningún efecto en la evolución del trasplante alogénico de M.O. Los genes KIR inhibitorios se muestran en la imagen del ejemplo (Gráfica N°9) con cubos blancos y los activadores como cubos negros. El donante tiene más genes activadores e inhibidores que el receptor. Además, se ilustra el haplotipo B del donante (más activadores) y el receptor es haplotipo A (Genes inhibitorios y un solo activador). El método requerido para determinarlo es el genotipo KIR de donante y del receptor.



Los resultados contradictorios de estos modelos han hecho difícil concluir cuál es el mejor modelo predictor de sobrevida del trasplante<sup>(13)</sup>.

## **HIPÓTESIS**

Dado que la célula NK del injerto alogénico puede ser potencialmente alorreactiva a partir de donantes con mayor contenido de genes KIR activadores o en aquellos receptores HLA idénticos de trasplante de células madres hematopoyéticas que no posean ligandos para KIR inhibitorio del donante, se esperaría que aquellos pacientes que recibieron trasplantes bajo estas condiciones presenten mejor evolución, en términos de menor recaída, reacción de injerto contra huésped y rechazo de injerto, así como mayor supervivencia.

## OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### Objetivo general:

Determinar la evolución de pacientes receptores de trasplante de células madres hematopoyéticas alogénico, a partir de la relación con sus respectivos donantes HLA idénticos en el contenido de genes KIR y HLA clase I.

### Objetivos específicos:

1. Realizar la tipificación de los genes KIR inhibidores (2DL1-5, 3DL1-3), KIR activadores (2DS1-5 y 3DS1), 2DL4 y los pseudogenes KIR (2DP1 y 3DP1) en parejas de receptores y donantes.
2. Realizar la tipificación de los alelos HLA C del grupo 1 y del grupo 2, en cada pareja de receptor y donante.
3. Evaluar la sobrevivencia y evolución del paciente mediante análisis multivariantes.
4. Analizar el potencial alorreactivo de NK, basado en la prevención de recaídas, utilizando 2 de los 4 diferentes modelos de alorreactividad de NK, como lo es el Modelo de Pérdida del Ligando y el Modelo Gen-Gen KIR.
5. Realizar asociación entre la presencia de distintos KIR con el diagnóstico de las enfermedades onco-hematológicas del estudio.

## MÉTODOS

### 1. Nivel y tipo de investigación:

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, con diseño de casos.

### 2. Población y muestra:

Se analizaron las muestras de ADN de 40 pacientes receptores de trasplante alogénico de células madres obtenidas de Médula ósea y sangre periférica, con sus respectivos 40 donantes hermano(a)s HLA idéntico, preservados en el Laboratorio de Inmunogenética del Instituto de Inmunología de la UCV, a los cuales se les determinó el Genotipo KIR y los alelos HLA C. Todos tenían pruebas de compatibilidad de HLA Clase-I (A y B) así como HLA clase-II que fueron practicadas previo a sus trasplantes. El estudio fue realizado con previa aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la UCV.

### Pacientes:

Se escogieron 40 muestras de sangre de individuos de ambos sexos y edades comprendidas entre 4 y 60 años, con las siguientes malignidades hematológicas: Leucemia linfoblástica aguda (LLA), Leucemia mieloide aguda (LMA), Leucemia mieloide crónica (LMC), Linfoma no Hodgkin (LNH) y Síndrome mielodisplásico (SM), pertenecientes al Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Clínicas Caracas, a quienes se les practicaron estudios de compatibilidad pre-trasplante (HLA clase I: A y B, clase II: DR-DQ, así como quimerismo en el post-trasplante) en el Laboratorio de Inmunogenética del Instituto de Inmunología de la UCV.

### 3. Procedimientos:

#### Tipo de muestra:

Se realizó extracción del ADN (en parejas de muestras de receptores y donantes) a partir del Buffy coat congelado a -20°C, con el Kit de extracción de ADN de AXYGEN® 50. Además, se obtuvo ADN previamente extraído por la Unidad de Inmunogenética conservado a -20°C en algunos de los pacientes y donantes en los cuales estaba disponible.

#### Técnica de extracción de ADN:

- Identificar tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (no provistos en el kit) por cada muestra a procesar.
- Añadir 500 µl de Buffer AP1 a cada tubo.
- Añadir 200-250 µl de la muestra a procesar. Tapar. Mezclar por 10 segundos.
- Añadir 100 µl del Buffer AP2. Tapar. Mezclar 10 segundos.
- Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar las columnas de extracción en tubos de microcentrífuga de 2 ml (provistos en el kit, previamente identificados según las muestras a procesar). Añadir el sobrenadante obtenido en el paso anterior en dichas columnas. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto.
- Retirar la columna y descartar por inversión el filtrado obtenido en el tubo de 2 ml. Colocar nuevamente la columna en el tubo. Añadir 700 µl del Buffer W1A en cada columna. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto.
- Retirar la columna y descartar por inversión el filtrado obtenido en el tubo de 2 ml. Colocar nuevamente la columna en el tubo. Añadir 800 µl del Buffer W2 en cada columna. Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto.

- Retirar la columna y descartar por inversión el filtrado obtenido en el tubo de 2 ml. Colocar nuevamente la columna en el tubo. Añadir 500 µl del Buffer W2 en cada columna. Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto.
- Retirar la columna y descartar por inversión el filtrado obtenido en el tubo de 2 ml. Colocar nuevamente la columna en el tubo. Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto.
- Colocar las columnas de extracción en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (provistos en el kit, previamente identificados según las muestras a procesar). Añadir 200 µl del Buffer TE en cada columna. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos. Descartar la columna. El ADN queda en el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.

*Determinación de la Concentración, Radio y Absorbancia de cada muestra:*

Se colocó en un tubo aparte 50 µl de agua libre de nucleasa mezclado con 10 µl de cada muestra del ADN obtenido en el paso anterior y se llevó al espectrofotómetro para determinar la concentración, el radio y la absorbancia del ADN de cada muestra (donantes y receptores). (Anexo N°1 y N°2).

*Estudio del genotipaje de KIR:*

El genotipaje de KIR se realizó mediante el uso del estuche comercial KIR Genotyping SSP Kit, de INVITROGEN®, el cual se basa en la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específicos (PCR-SSP) para detectar 14 genes KIR (2DL1-5, 2DS1-5, 3DL1-3 y 3DS1) así como 2 pseudogenes (2DP1 y 3DP1), para amplificación por PCR, que fueron separados en un gel de agarosa por electroforesis, visualizados con Bromuro de Etidio, expuestos a luz UV, documentados por fotografía e interpretados por presencia o ausencia del producto específico de PCR<sup>(41)</sup>.

### Amplificación por PCR:

#### *Material empleado:*

- Termociclador Peltier thermalcycler DNA Engine DYAD y termociclador ptc-200 DNA Engine.
- 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), sustratos para polimerizar nuevo ADN.
- Dos cebadores o iniciadores (en inglés, *primers*), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre 6 y 40 nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.
- Iones divalentes. Se suele usar magnesio ( $Mg^{2+}$ ), agregado comunmente como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso ( $Mn^{2+}$ ), para mutagénesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de  $Mn^{2+}$  incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa.
- Iones monovalentes, como el potasio.
- Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa con temperatura óptima alrededor de 70 °C (polimerasa Taq).
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.

- Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo.

El proceso de PCR consistió en una serie de 30 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo consistió en 3 pasos a diferentes temperaturas: 94°C por 20 segundos, 63°C por 20 segundos y 72°C por 90 segundos, seguidos por un choque térmico (llamado "hold") al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje<sup>(39)</sup> a 4°C por un tiempo indefinido o hasta que sea detenido. El volumen total de la reacción (aceite de parafina y la mezcla de reacción) en cada pozo fue de 23 µl<sup>(42)</sup>.

#### Electroforesis en gel:

Posteriormente el amplificado fue leído en un gel de electroforesis. La técnica de electroforesis en geles de agarosa se realizó en cubetas apropiadas (cámara para corridas electroforéticas; Conacit-bienes nacionales # 26881), cumpliéndose con la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio tamponado que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. La fase estacionaria o soporte, es un polímero de naturaleza gelatinosa con un tamaño de poro homogéneo que se encuentra sumergido y embebido en la fase móvil. El polímero utilizado para el análisis electroforético fue la agarosa (para ácidos nucleicos de gran tamaño -100pb-10kb)<sup>(41)</sup>.

La migración de los fragmentos de ácidos nucleicos (ADN ) en el gel de agarosa se realizó sometiéndolo a un campo eléctrico, con voltaje del campo en 130 voltios (equipo para voltaje Buchles Instrument 1500volt power supply ).

### Visualización del Amplificado:

Transcurrida la electroforesis, la localización de los fragmentos se determinó mediante la tinción con bromuro de etidio, una sonda fluorescente tras iluminación con luz UV. Es un método generalizado de detección de fragmentos de ADN, ya que la sonda se intercala entre la doble hélice de ADN y emite luz <sup>(41)</sup>. Las bandas son visualizadas en una cámara de rayos UV (equipo UVP transiluminador de geles M-26 115 v. 60hz.0,70 amps) y captadas por fotografía con cámara Polaroid y con archivo de la imagen en programa de computación Kodak 1D (cámara polaroid para revelado fotográfico de geles).

### Estudio de HLA-C:

La determinación de HLA clase I (A y B) se realizó previamente en el laboratorio de Inmunogenética del IDI en el período pre-trasplante, para estudios de compatibilidad entre donantes y receptores y se dispuso de estos datos. Para completar el estudio de toda la serie de genes clase I, se realizó el tipaje de HLA C mediante el uso del estuche comercial Olerup SSP HLA A-B-C Combi Tray ® (misma técnica utilizada por la Unidad de Inmunogenética del IDI para la determinación de HLA A-B y clase II), el cual se basa en cebadores específicos de Secuencia 5'-3' para el grupo de alelos HLA-C\*01:02 al C\*18:03, para amplificación por PCR, separados en un gel de agarosa por electroforesis, visualizados con Bromuro de etidio, expuestos a luz UV, documentados por fotografía e interpretados por presencia o ausencia del producto específico de PCR.

### Ficha de recolección de la información:

Una vez seleccionados los individuos del estudio y finalizados los procedimientos experimentales, se revisaron las historias clínicas de los 40 pacientes y los datos de sus correspondientes 40 donantes, del servicio de Onco-hematología del Hospital de Clínicas Caracas, tanto en el área de consultas médicas de Fundamédula como en el área de Registros médicos de dicha clínica, tomándose en cuenta

la edad, sexo, lugar de nacimiento, comorbilidades, diagnóstico de la enfermedad hematológica, fecha y edad al diagnóstico y al trasplante, características del donante hermano relacionado, serología viral (CMV, VEB, VIH, VDRL, VHB, VHC, Toxotest, Herpes virus, Chagas), Protocolo utilizado para el Régimen de Condicionamiento, evolución del paciente en el post-trasplante (con corte al momento de revisión de historias): reacción de injerto contra huésped, rechazo al trasplante, recaída, infecciones, supervivencia con eventos y supervivencia libre de eventos, remisión y dosis del Injerto de células madres. (Anexo N°3 y N°4).

#### **4. Tratamiento estadístico:**

Para el análisis estadístico descriptivo se utilizaron medidas tales como: media, error estándar, desviación estándar, Coeficiente de Variación, Coeficiente de Contingencia, tablas de contingencia y ANOVAs.

La probabilidad de supervivencia general, supervivencia libre de eventos, supervivencia con eventos y recaídas se realizó por el método de Kaplan-Meier.

Los cálculos se realizaron en SPSS 14 y excel.

## RESULTADOS

### 1. Características generales de los pacientes:

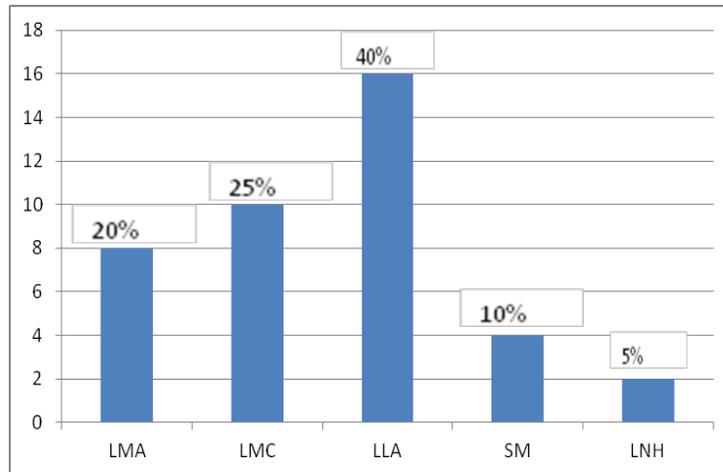
Las características de los 40 pacientes enrolados en el estudio se enlistan en la tabla N°7. Los diagnósticos específicos de las distintas malignidades hematológicas para cada paciente se aprecian en la grafica N°10.

**Tabla N°7. Características Demográficas y Clínicas de los pacientes.**

<b>Característica</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b><u>Sexo:</u></b>		
Masculino	18	45%
Femenino	22	55%
<b><u>Lugar de nacimiento:</u></b>		
Venezuela	38	95%
Siria	1	2,5%
Desconocido	1	2,5%
<b><u>Diagnósticos:</u></b>		
Leucemia Mieloide Aguda	8	20%
Leucemia Mieloide Crónica	10	25%
Leucemia Linfoblástica Aguda	16	40%
Síndrome Mielodisplásico	4	10%
Linfoma no Hodgkin	2	5%
<b>Total de pacientes</b>	<b>40</b>	<b>100%</b>
<b><u>Edad al TMO(n=38):</u></b>		
< 18 años	15	39,4%
>18 años	23	60,6%
<b>Edad media al TMO (rango años)</b>	<b>27,1 (4-60)</b>	<b>-</b>

**Nota:** Todos los sujetos del estudio tenían malignidades hematológicas de mal pronóstico. La edad en dos pacientes no pudo establecerse. Los pacientes nacieron en distintas partes del país excepto un (1) paciente nacido en Siria (Anexo N°5). Los antecedentes patológicos de los pacientes se muestran en Anexos. (Anexo N°6).

**Gráfico N°10. Diagnósticos de Enfermedades hematológicas malignas (n=40)**



**LMA:** Leucemia Mieloide Aguda, **LMC:** Leucemia Mieloide Crónica, **LLA:** Leucemia Linfoblástica Aguda, **SM:** Síndrome mielodisplásico, **LNH:** Linfoma no Hodgkin

## 2. Características de los Donantes:

Las características generales de los donantes de células madres hematopoyéticas del estudio se enlistan en la tabla N° 8.

**Tabla N°8. Características de los Donantes (n=40)**

<b>Características</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b><u>Sexo:</u></b>		
<b>Masculino</b>	19	47,5%
<b>Femenino</b>	21	52,5%
<b><u>Relación parental:</u></b>		
<b>Hermano relacionado</b>	39	97,5%
<b>Gemelo probablemente Singénico</b>	1	2,5%

**Nota:** Tres parejas de “Hermanos relacionados” se trataron de embarazos bivitelinos (Gemelos fraternales) con diferencias genéticas demostradas en sus genes KIR y/o quimerismos. La pareja de Gemelos que fue considerada probablemente Singénica, presentó genes HLA y KIR idénticos además de imposibilidad para diferenciar células autólogas de alogénicas en las pruebas de quimerismos, por lo que *no fue incluido en los análisis de modelos predictores de alorreactividad* por considerarse un trasplante de tipo Singénico.

### **3. Generalidades de los estudios pretrasplante:**

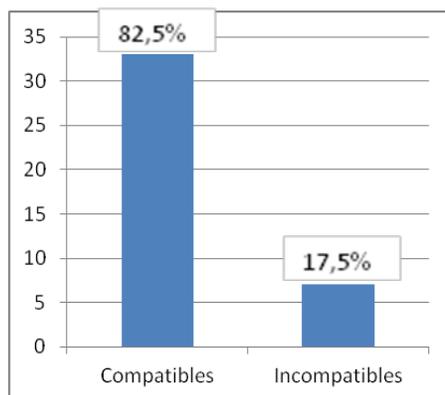
#### **3.1. Compatibilidad de HLA (Antígenos de histocompatibilidad):**

Todas las parejas de receptores y sus donantes correspondientes son compatibles en todos los alelos de los HLA clase I y II, lo cual es un requisito indispensable en la actualidad para la realización de trasplantes de células madres para enfermedades hematopoyéticas malignas en nuestro país (Anexos N°7, N°8 y N°9).

### **3.2. Compatibilidad de grupos sanguíneos entre Donantes y Receptores:**

Aunque la incompatibilidad de grupos sanguíneos no contraindica el trasplante de células madres hematopoyéticas (a diferencia de lo que ocurre con los trasplantes de órganos) se determinó el grado de compatibilidad de los mismos en las parejas de donante y receptores, porque puede aumentar la morbilidad del receptor y requerir en algunos casos el mayor uso de hemoderivados en el post-trasplante. Sin embargo, al revisar los resultados notamos que más del 80% de los trasplantes fueron realizados entre individuos compatibles en su sistema ABO (Gráfico N°11). Solo presentaron incompatibilidad de grupo sanguíneo 7/40 parejas (17,5%) de receptores y donantes, evidenciándose 4 (57,1%) donantes grupo A para receptores grupo O, 1(14,3%) donante grupo O para receptor grupo B (individuos con grupo O se consideran donantes universales sin constituir un riesgo al receptor en este sistema), 1 (14,3%) donante grupo A para receptor B y 1 (14,3%) donante B para un receptor A. (Anexo N°10)

**Gráfico N°11. Compatibilidad de Grupos Sanguíneos (n=40)**



### **3.3. Compatibilidad del Factor RH entre Donantes y Receptores:**

En todas las 40 parejas del estudio se encontró compatibilidad de factor RH, distribuidas de la siguiente manera: 36/40 (90%) parejas de donantes y receptores con Factor RH positivo, 3/40 (7,5%) parejas con Factor RH negativo y 1/40 (2,5%) pareja en donde no se encontró el reporte (Anexo N°11). Para el momento de los trasplantes en ninguno de los sueros de las 40 parejas se encontraron autoanticuerpos, aloanticuerpos y los estudios de Coombs directo e indirecto resultaron negativos.

### **4. Tratamientos:**

Los diferentes regímenes de acondicionamiento aplicados a los pacientes se muestran a continuación (Tabla N°9 y 10):

**Tabla N°9. Régimen de Acondicionamiento para el trasplante (n=40)**

<b>Régimen</b>	<b>Pacientes N (%)</b>
<b>Mieloablatoivo</b>	35 (87,5%)
<b>No Mieloablatoivo (Fludarabina/Melfalan)</b>	4 (10%)
<b>No especificado</b>	1 (2,5%)
<b>Total</b>	40 (100%)

**Nota:** Los pacientes en régimen no mieloablatoivo tenían edades comprendidas entre 40 y 60 años, 3 de los cuales tenían diagnóstico de Síndrome mielodisplásico y 1 Leucemia linfoblástica aguda.

**Tabla 10. Regímenes Mieloablativos aplicados a los pacientes (n=35)**

<b>Régimen Mieloablativo</b>	<b>Pacientes N (%)</b>
<b>Busulfex/Fludarabina</b>	7 (20%)
<b>Busulfex/Ciclofosfamida</b>	21 (60%)
<b>Ciclofosfamida/Radiación corporal total</b>	5 (14,3%)
<b>BEAM (Cytarabina-Etoposido-Melfalan)</b>	2 (5,7%)
<b>Total</b>	35 (100%)

## **5. Características inherentes al trasplante:**

### **5.1. Vía de Obtención del Injerto para el Trasplante:**

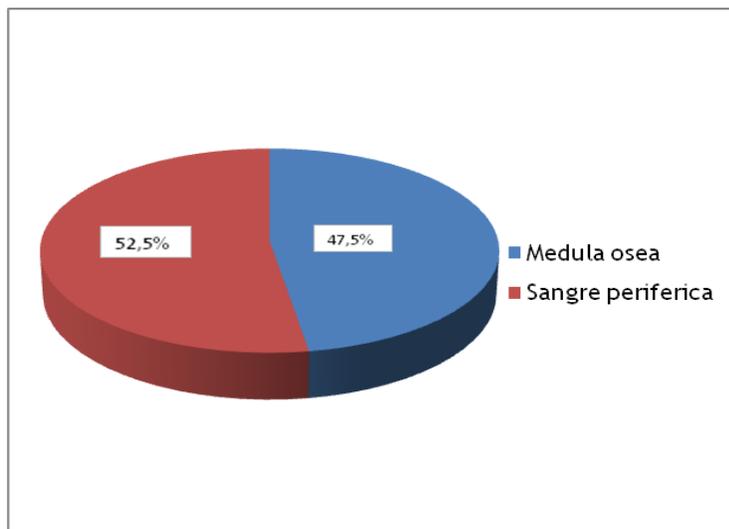
Los Injertos de células madres para los trasplantes realizados en el Hospital de Clínicas Caracas son obtenidos de dos maneras: a través de la movilización de las células madres a sangre periférica con preparación previa de los donantes: En esta preparación se administra al donante seleccionado Factores estimuladores de colonia de Granulocitos-Macrofagos (Neupogen® ó Granocyte®) 12 mcgr/KG/día, vía subcutánea cada 12 horas comenzando el día -5 del trasplante y al administrarse la última dosis a las 6:00 am del día 0 (día previsto para el trasplante) el donante acude al Banco de Sangre del Hospital de Clínicas Caracas a las 7:30 am para practicarle contaje de leucocitos en sangre periférica, si éste es adecuado (>20.000 leucocitos) el donante es sometido a una máquina de Aferesis (Equipo separador de células Fenwal CS3000) con colocación de cateter en vena central del cuello para la colecta o mediante la obtencion directa de células madres a partir de la Médula Ósea (crestas ilíacas). La decisión del uso de una vía u otra depende exclusivamente del medico hemato-óncologo especializado en trasplante, quien realiza el procedimiento.(Tabla N°11 y gráfico N°12).

**Tabla N°11. Vía de Obtención del Injerto (n=40)**

Vía	N°	%
Medula Ósea	19	47,5%
Sangre Periférica	21	52,5%
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100%</b>

**Nota:** Todos los pacientes del estudio recibían trasplantes por primera vez. Los 40 trasplantes del estudio fueron realizados en el Hospital de Clínicas Caracas entre el año 2000 y 2010.

**Gráfico N°12. Vía de Obtención del Injerto (n=40)**



## **5.2. Dosis de Células CD34+ infundidas a los receptores de trasplante:**

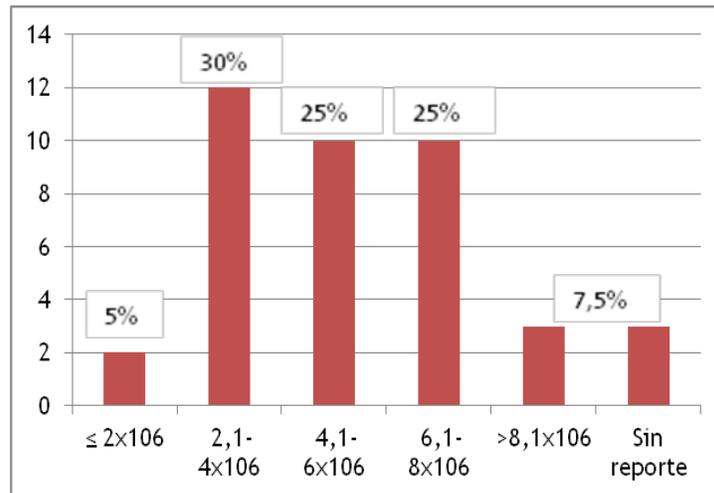
Luego de la obtención de la muestra para el trasplante, ya sea vía sangre periférica o vía medula ósea, se envían 10cc de la muestra a citometría de flujo en el Hospital de Clínicas Caracas donde se

realiza marcaje con CD34, CD3 y CD45 y se observa en el citómetro con colorimetría para contabilizar el número de CD34+ en la muestra (en la gran mayoría de las muestras evaluadas no se encontraron los reportes en las historias clínicas de CD3 y CD45) y sobre la base de este resultado se estandariza con fórmulas internacionales el valor total de CD34+ en el donante. Este valor se divide entre los Kilogramos de peso del receptor y se estima finalmente el número  $\times 10^6$  células CD34+ /kilogramo de peso del receptor, las cuales son infundidas en el receptor. La obtención de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células CD34+/Kg del receptor son aceptadas por el equipo de trasplante en Venezuela para someterlo al procedimiento (Tabla N°12). Las diferentes dosis de células CD34+ se visualizan en el gráfico N°13.

**Tabla N°12. Dosis de Células CD34+ Infundidas a los receptores de trasplante (n=40)**

<b>Células CD34+ infundidas</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
$\leq 2 \times 10^6$	2	5%
$2,1-4 \times 10^6$	12	30%
$4,1-6 \times 10^6$	10	25%
$6,1-8 \times 10^6$	10	25%
$>8,1 \times 10^6$	3	7,5%
<b>Sin reporte</b>	3	7,5%
<b>Total</b>	40	100%

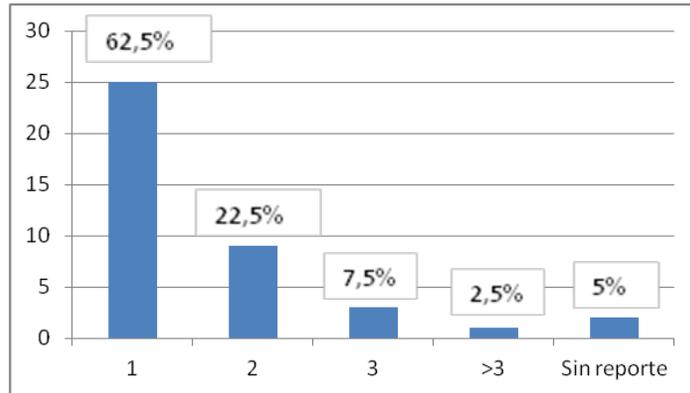
**Gráfico N°13. Dosis de Células CD34+ Infundidas a los receptores de trasplante (n=40)**



**5.3. Número de colectas para obtener el injerto:**

Se contabilizó el número de veces que fue necesario realizar la obtención de la muestra a partir del donante hasta tener una cantidad suficiente para el trasplante, evidenciándose que la mayoría (62,5%) se obtuvo en 1 sola toma de la muestra. (Gráfico N°14). En 25 donantes se realizó 1 sola colecta de células madres con obtención de  $>2 \times 10^6$  células CD34+, 9 donantes necesitaron ser sometidos a 2 colectas para la obtención del injerto, 3 se sometieron a 3 donaciones y en 1 se necesitó más de 3 colectas. En 2 donantes no se obtuvo el dato del número de colectas.

**Gráfico N°14. Número de Colectas para obtener el Injerto (n=40)**



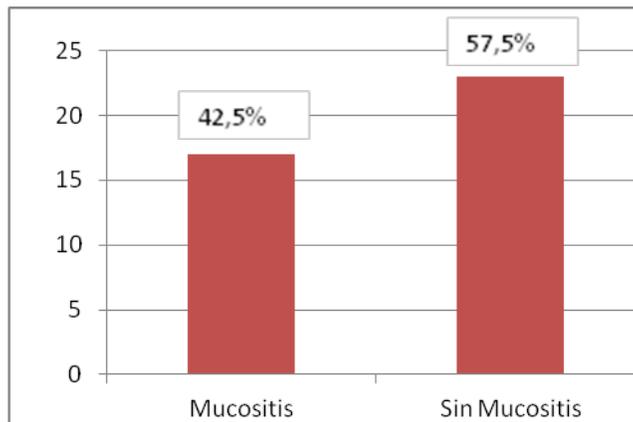
**6. Evolución general de los pacientes en el post-trasplante:**

**6.1. Afectación de Tejidos y Órganos relacionados al trasplante:**

**6.1.1. Mucositis:**

Se realizó distinción de los casos con mucositis evidenciándose su presencia en 17/40 (42,5%) pacientes del estudio en el post-trasplante. (Gráfico N°15).

**Gráfico N°15. Diagnóstico de Mucositis en pacientes post-trasplantados. (n=40)**



### **6.1.2. Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH):**

Este diagnóstico fue realizado a través de biopsias de tejidos afectados evidenciándose su presencia en 16/40 pacientes (40%). (Tabla N°13)

**Tabla N°13. Enfermedad de Injerto contra huésped en pacientes del estudio (n=40)**

<b>EICH</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b>Presente</b>	16	40%
<b>Ausente</b>	24	60%
<b>Total</b>	40	100%

En 6/16 (37,5%) casos se trató de Enfermedad Aguda de Injerto contra huésped (EICHa) y en 8/16 (50%) casos Crónica (EICHc), encontrándose ambos en 2/16 (12,5%) pacientes con este cuadro. (Tabla N° 14)

**Tabla N°14. Clasificación de la Enfermedad de Injerto contra Huésped (n=16)**

<b>EICH</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b>EICH aguda</b>	6	37,5%
<b>EICH crónica</b>	8	50%
<b>EICH aguda-crónica</b>	2	12,5%
<b>Total</b>	16	100%

Al evaluar los 6/16 casos de EICHa (Enfermedad Aguda de Injerto contra Huésped) y la afectación orgánica asociada notamos 2/6 casos con afectación Intestinal, 2/6 casos con Enfermedad

Aguda de Injerto contra huésped Hepática y 2/6 casos con compromiso multiorgánico de piel, Intestino e hígado.

En cuanto a los 8 casos con Enfermedad Crónica de Injerto contra Huésped (EICHc) se observó 4/8 casos con compromiso Hepático, 2/8 casos de Piel y 2/8 casos con afectación multiorgánica de hígado, piel e intestino (Tabla N°15)

**Tabla N°15. Afectación Orgánica en pacientes con Diagnóstico de EICHc. (n=8)**

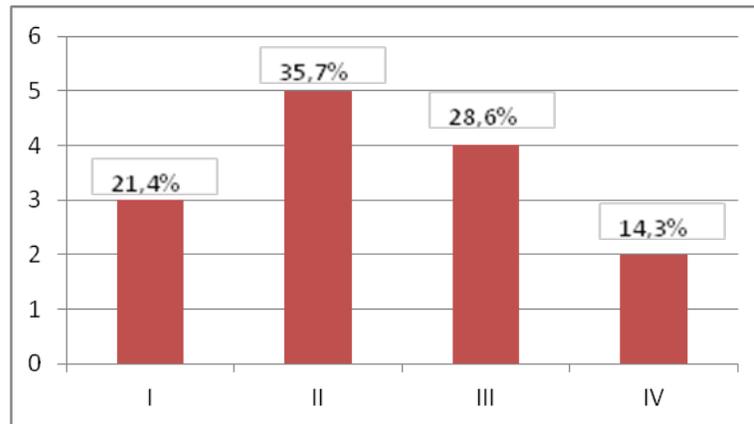
<b>EICHc</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b>Hepática</b>	4	50%
<b>Piel</b>	2	25%
<b>Hígado-piel-Intestino</b>	2	25%
<b>Total</b>	8	100%

Así mismo, cuando revisamos la afectación de tejidos y órganos en los 2 casos con EICH aguda y crónica, 1 caso presentó en fase aguda afectación intestinal y en la etapa crónica compromiso pulmonar y el otro caso manifestó EICHa de piel y en etapa crónica de hígado e intestino.

#### **6.1.2.1. Severidad de la Enfermedad de Injerto contra Huésped:**

Se encontró reportes del grado de severidad de la Enfermedad de Injerto contra huésped en 14/16 casos (87,5%) señalándose a 3/14 (21,4%) pacientes con grado I de severidad, 5 (35,7%) casos grado II, 4 (28,6%) casos grado III y 2 (14,3%) casos grado IV (Gráfico N°16).

**Gráfico N°16. Grado de Severidad de la EICH (n=14)**



### 6.2. Rechazo al Injerto:

Solo se presentó rechazo al injerto en 1/40 de los receptores de trasplantes, ocurriendo al 4to mes post-trasplante, lo cual fue corroborado a nivel de laboratorio por la reducción progresiva y acelerada del quimerismo hasta llegar a la ausencia total (0%). Por lo que al tratarse de un dato escaso no se incluyó en el análisis estadístico.

### 6.3. Recaídas:

Las recaídas de las neoplasias (tanto hematológicas como extramedulares) se presentaron en 14 (35%) de los 40 pacientes enlistados en el estudio (Tabla N°16).

**Tabla N°16. Pacientes trasplantados con recaídas en el post-trasplante (n=40)**

Recaída	N°	%
Presente	14	35%
Ausente	26	65%
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100%</b>

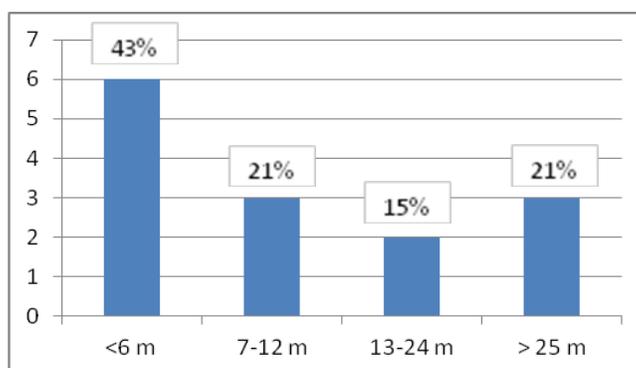
### 6.3.1. Tiempo transcurrido entre el Trasplante y la Recaídas:

En 6/14 (42,8%) pacientes se presentó la recaída en los 6 primeros meses post-trasplante, en 3/14 (21,4%) pacientes entre los 7-12 meses después, 2 /14 (14,2%) entre los 13 y 24 meses, y 3/14 (21,4%) después de los 25 meses post-trasplante, con un rango de 2 meses a 30 meses, un promedio de 4,2 meses (desviación estándar de 8,3 y coeficiente variable de 197,16% (Tabla y Gráfico N°17)

**Tabla N° 17. Tiempo transcurrido entre el trasplante y las recaídas.(n=14)**

Tiempo transcurrido	N°
Rango (meses)	2-30 meses
Promedio	4,2 meses
Desviación standard	8,3
Coeficiente de variación	197,16%

**Gráfico N°17. Tiempo transcurrido entre el Trasplante y la Recaída. (n=14)**



#### 6.4. Remisión:

Todos los pacientes se encontraban en remisión en el post-trasplante. La remisión es la disminución o desaparición de los signos y síntomas del cáncer<sup>(4)</sup>. Esto se confirma a nivel de laboratorio con el estudio periódico post-trasplante del fenotipaje celular en el aspirado de M.O. Por ejemplo, y se consideró el tiempo durante el cual el paciente se mantuvo sin enfermedad hematológica maligna e inclusive extramedular luego del trasplante hasta el momento de la recaída, es decir, el retorno de una enfermedad o de los síntomas y signos de una enfermedad después de un período de mejoría (a nivel de laboratorio por la presencia de fenotipo maligno o blastos leucémicos en las muestras de control de M.O u otro líquido o tejido). Por lo cual se evaluaron los pacientes que presentaron recaídas y no se incluyó el resto, ya que el tiempo de remisión de la enfermedad podía estar influenciado por el corte de las historias al fallecer por otras causas y por la ausencia de evoluciones al no asistir a controles. En los 14 pacientes que presentaron recaídas encontramos rangos de tiempo de 2 a 30 meses de remisión con un promedio de 12 meses (Desviación estándar 10,243 y Coeficiente variación 85,35). (Tabla N°18).

**Tabla N°18. Duración de la remisión post-trasplante hasta la presencia de recaídas (n=14)**

<b>Tiempo transcurrido</b>	<b>N°</b>
<b>Rango (meses)</b>	2-30 meses
<b>Promedio</b>	12
<b>Desviación standard</b>	10,24
<b>Coeficiente variable</b>	85,35

## **6.5. Fallecimientos generales:**

Al momento de la última evolución reportada en las historias se determinó que 14/40 (35%) pacientes habían fallecido y se desconocía si 5/40 (12,5%) pacientes vivían o no, ya que por distintas razones se perdió el contacto con los mismos (salida del país, retorno a sus estados de origen, no asistencia a consultas de control). Tabla N°19.

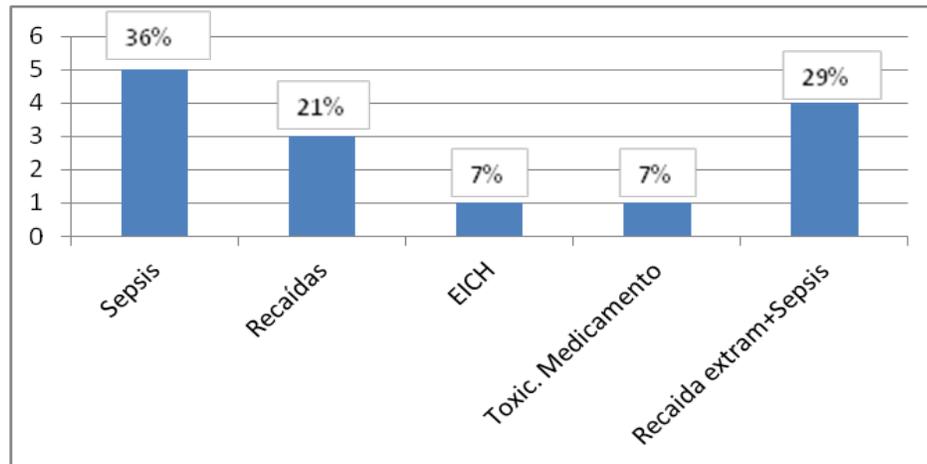
**Tabla N°19. Mortalidad de Pacientes hasta la última evolución clínica. (n=40)**

<b>Mortalidad</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b>Fallecidos</b>	14	35%
<b>Vivos</b>	21	52,5%
<b>Desconocido</b>	5	12,5%
<b>Total</b>	40	100%

### **6.5.1. Causas de Fallecimiento de los pacientes:**

Cuando evaluamos las causas de las muertes de los 14/40 (32,5%) pacientes reportados como fallecidos encontramos que 5/14 (36%) pacientes fallecieron por Infecciones tipo Sepsis, una inició con neumonía y el resto con punta de partida intestinal, 3/14 (21%) fallecieron por Recaídas de las cuales 1 fue extramedular del SNC y las otras 2 fueron hematológicas, 1/14 (7%) falleció por Enfermedad de Injerto contra huésped, 1/14 (7%) por toxicidad medicamentosa, 3/14 (29%) por recaídas extramedulares asociadas a Sepsis (Gráfico N° 18)

**Gráfico N°18. Causas de Mortalidad de los Pacientes. (n=14)**



**7. Estudio Genético de Receptor tipo Inmunoglobulina de NK (KIR):**

Luego de realizar los procedimientos de laboratorio y obtener las combinaciones genéticas de los KIR de cada paciente y de cada donante se introdujo esta información en la base de datos de la pagina web allelefrequencies.net<sup>(43)</sup> con lo cual el buscador ubica automáticamente tanto el haplotipo como el genotipo en cada individuo (esto se hace según el tipo y número de genes KIR inhibidores y activadores presentes en cada individuo evaluado) y permite conocer además todas las descripciones mundiales en las cuales se han encontrado los mismos, por lo que obtuvimos los genotipos y haplotipos KIR de todos los individuos del estudio (Gráficos N°19 y N°20):

**Gráfico N°19. Genotipos y haplotipos KIR de pacientes receptores de trasplante de células madres hematopoyéticas(n=40)**

Receptores	Haplotipo	ID Genotipo	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
R1	Bx	2																
R2	Bx	202																
R3	AA	1																
R4	AA	1																
R5	Bx	63																
R6	Bx	11																
R7	AA	1																
R8	Bx	4																
R9	Bx	2																
R10	Bx	7																
R11	Bx	81																
R12	Bx	4																
R13	AA	1																
R14	Bx	4																
R15	AA	1																
R16	AA	156																
R17	Bx	2																
R18	Bx	3																
R19	Bx	3																
R20	Bx	80																
R21	Bx	5																
R22	AA	1																
R23	AA	203																
R24	Bx	5																
R25	Bx	106																
R26	Bx	4																
R27	Bx	2																
R28	Bx																	
R29	Bx	71																
R30	Bx	292																
R31	Bx	4																
R32	Bx	6																
R33	Bx	68																
R34	AA	1																
R35	Bx	2																
R36	Bx	18																
R37	Bx	7																
R38	AA	1																
R39	AA	1																
R40	Bx	5																

Leyenda:

Presente	Presente
Ausente	Ausente
no realizado	no realizado
No reportado	No reportado
Desconocido	Desconocido
haplo AA	haplo AA
haplo Bx	haplo Bx

**Gráfico 20. Genotipos y haplotipos KIR de donantes de trasplante de células madres hematopoyéticas (n=40)**

Donantes	Haplotipo	ID Genotipo	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
D1	Bx	4																
D2	Bx	2																
D3	AA	1																
D4	Bx	17																
D5	Bx	4																
D6	Bx	5																
D7	AA	1																
D8	Bx																	
D9	Bx	80																
D10	Bx	7																
D11	Bx	73																
D12	Bx	23																
D13	AA	1																
D14	Bx	9																
D15	Bx	30																
D16	Bx	4																
D17	Bx	2																
D18	Bx	106																
D19	Bx	9																
D20	AA	1																
D21	Bx	38																
D22	AA	1																
D23	Bx	33																
D24	Bx	63																
D25	Bx	68																
D26	Bx	4																
D27	AA	1																
D28	Bx	69																
D29	Bx	71																
D30	Bx	12																
D31	Bx	4																
D32	Bx	6																
D33	Bx	68																
D34	Bx	14																
D35	Bx	18																
D36	Bx	2																
D37	Bx	7																
D38	Bx	3																
D39	AA	1																
D40	Bx	5																

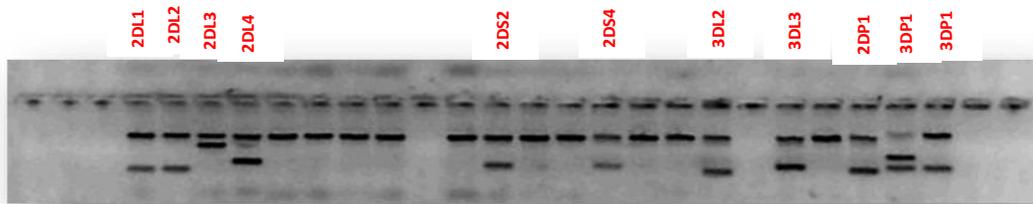
Leyenda:

Presente	Presente
Ausente	Ausente
no realizado	no realizado
No reportado	No reportado
Desconocido	Desconocido
haplo AA	haplo AA
haplo Bx	haplo Bx

### 7.1. Estudio de Genotipos KIR:

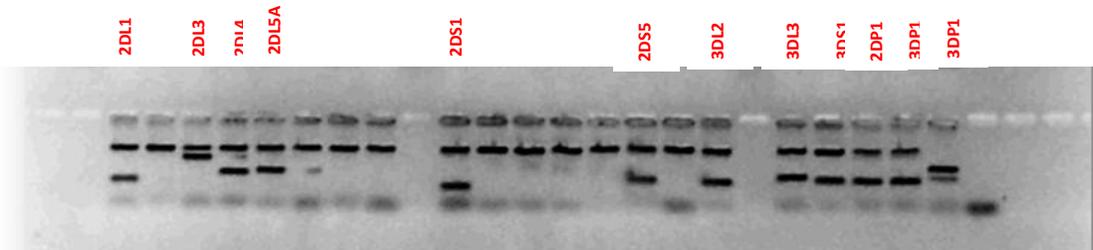
Al evaluar los genotipos de las 40 parejas de donantes y receptores se encontraron dos genotipos no reportados previamente en la literatura mundial. Al consultar la base de datos de la página web [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net)<sup>(43)</sup>, cada uno correspondiente a un donante y a un receptor (los cuales no constituían una pareja) siendo corroborados en una segunda determinación. (Gráficos N° 21 y N°22)

**Gráfico N°21. Genes KIR en Donante# 8.**



**Donante 8 (D8):** KIR2DL1, 2DL3, 2DS4, 2DL2, 2DS2, 2DL4, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1

**Gráfico N°22. Genes KIR en Receptor # 28**



**Receptor 28 (R28):** KIR2DL1, 2DL3, 3DS1, 2DS1, 2DS5, 2DL4, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1

**Nota:** Según el inserto del estuche KIR Genotiping SSP Kit, deben estar presentes bandas en los pozos 5 y 6, correspondientes a grupos de alelos para 2DL5A respectivamente, para poder decir que este gen está presente, por lo tanto al definirse 1 banda solo en el pozo 5 y no en el 6 no se consideró la presencia de este gen, siendo confirmado este resultado en una segunda determinación. (Anexo N° 12)

### 7.1.1. Frecuencia de los distintos genotipos :

Se especifican en las tablas 20 y 21 los distintos genotipos presentados por los pacientes y sus donantes, así como la frecuencia de los mismos.

**Tabla N°20. Frecuencia de Distintos genotipos encontrados en los receptores (n=39)**

Genotipos	N° Pacientes	% Pacientes
<b>1</b>	9	23,00%
<b>2</b>	5	13,00%
<b>3</b>	2	5%
<b>4</b>	5	13,00%
<b>5</b>	3	8,50%
<b>6</b>	1	2,50%
<b>7</b>	2	5%
<b>11</b>	1	2,50%
<b>18</b>	1	2,50%
<b>63</b>	1	2,50%
<b>68</b>	1	2,50%
<b>71</b>	1	2,50%
<b>80</b>	1	2,50%
<b>81</b>	1	2,50%
<b>106</b>	1	2,50%
<b>156</b>	1	2,50%
<b>202</b>	1	2,50%
<b>203</b>	1	2,50%
<b>292</b>	1	2,50%

**Nota:** No se incluyó al paciente R28 por no determinarse su genotipo en la página allelesfrequencies.net (pero se pudo determinar en dicha página que pertenecía al haplotipo Bx por el número de KIR activadores). Se destacan en rojo los genotipos pertenecientes al haplotipo AA (Genotipo: 1, 156 y 203 que representan 11 pacientes, por lo que los restantes 28 pacientes son Bx)

**Tabla N°21. Frecuencia de Distintos genotipos encontrados en los donantes (n=39)**

Genotipos	N° Donantes	% Donantes
<b>1</b>	7	20%
<b>2</b>	3	9%
<b>3</b>	1	2,50%
<b>4</b>	5	13,50%
<b>5</b>	2	5%
<b>6</b>	1	2,50%
<b>7</b>	2	5%
<b>9</b>	2	5%
<b>12</b>	1	2,50%
<b>14</b>	1	2,50%
<b>17</b>	1	2,50%
<b>18</b>	1	2,50%
<b>23</b>	1	2,50%
<b>30</b>	1	2,50%
<b>33</b>	1	2,50%
<b>38</b>	1	2,50%
<b>63</b>	1	2,50%
<b>68</b>	1	2,50%
<b>69</b>	1	2,50%
<b>71</b>	1	2,50%
<b>73</b>	1	2,50%
<b>80</b>	1	2,50%
<b>106</b>	1	2,50%

Se encontraron 23 genotipos distintos en los donantes de trasplante del estudio siendo el más frecuente el genotipo 1 (20% pacientes), seguido del genotipo 4 (13,5% de los donantes del estudio).

Se destaca en rojo el único genotipo perteneciente al haplotipo AA en este grupo (Genotipo 1) el cual se encontró en 7 donantes, por lo que los restantes 32 donantes son Bx.

**Nota:** No se incluyó al donante D8 por no determinarse su genotipo en la página [allelesfrequencies.net](http://allelesfrequencies.net) <sup>(43)</sup> (pero se pudo determinar en dicha página que pertenecía al haplotipo Bx por el número de KIR activadores).

## **7.2. Estudio de Haplotipos KIR (AA y Bx):**

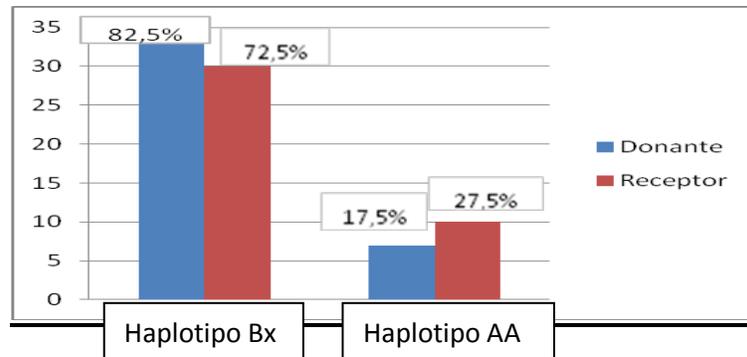
Los haplotipos KIR fueron obtenidos a través de la consulta a la base de datos de la página web [allelesfrequencies.net](http://allelesfrequencies.net). (al igual que los genotipos). Recordemos que los pacientes homocigotos para el haplotipo KIR A solo codifican un (1) KIR activador y presentan mayor número de KIR inhibidores en forma más homogénea que los Haplotipos Bx (no se especifica si son BB o BA) los cuales son más variables en su conformación genética pero con mayor predominio de KIR activadores.

### **7.2.1. Frecuencia de Haplotipos Bx y Haplotipos AA:**

Se observó mayor frecuencia de haplotipos Bx en ambos grupos, con predominio en el grupo de donantes 33/40 (82,5%) en comparación con los Receptores 29/40 (72,5%). En cuanto al Haplotipo AA los pacientes receptores de trasplante tenían mayor frecuencia (no significativa) 11/40 (27,5%) que sus hermanos donantes 7/40 (17,5%) . Grafica N°23.

**Grafica N°23. Frecuencia del total de Haplotipos Bx y Haplotipos AA en donantes y receptores.**

(n=40)

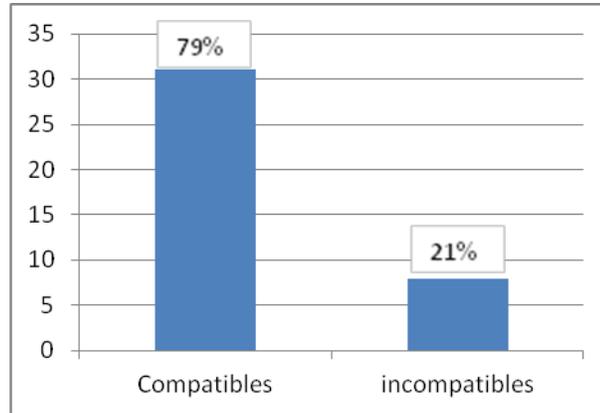


### **7.2.2. Compatibilidad de haplotipos y genotípos KIR entre donantes y receptores:**

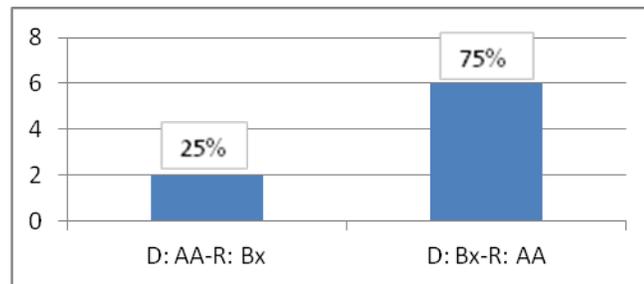
Aunque los trasplantes en Venezuela se realizan entre hermanos HLA idénticos es conocido que el sistema KIR se hereda independiente del HLA por lo cual evaluamos las compatibilidades o incompatibilidades en el sistema KIR en cada pareja de donantes y receptores y al comparar haplotipos en los 39 evaluados, 8 (21%) tenían haplotipos KIR no compatibles y los restantes 31 pares de receptores y donantes (79%) tenían Haplotipos KIR compatibles (Grafica N° 24).

Además, de las 8 parejas con incompatibilidad haplotípica se determinó que 2/8 (25%) correspondían a donantes AA con receptores Bx y 6/8 (75%) correspondientes a donante Bx con receptor AA (Grafico N°25) y de las 31/39 parejas con compatibilidad haplotípica se evidenció que 5/31 (16,1%) correspondían a donante AA con receptor AA y 26/31 (83,9%) correspondieron a donante Bx con receptor Bx (Grafica N° 26).

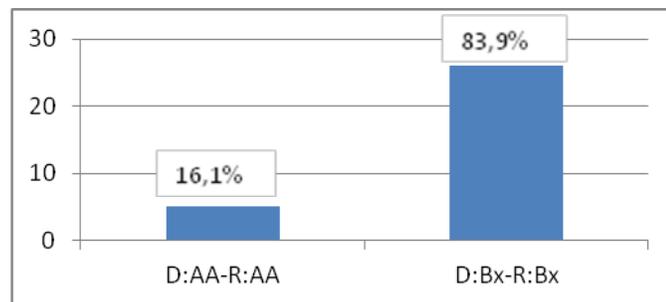
**Grafica N° 24. Haplotipos KIR compatibles (AA-AA y Bx-Bx) y no compatibles (AA-Bx y Bx-AA) entre donantes y receptores (n=39)**



**Grafica N°25. Combinaciones de haplotipos KIR (AA-Bx y Bx-AA) en parejas de donantes y receptores incompatibles (n=8)**



**Grafica N°26. Frecuencia de combinaciones de haplotipos KIR (AA-AA y Bx-Bx) en parejas de donantes y receptores compatibles (n=31)**

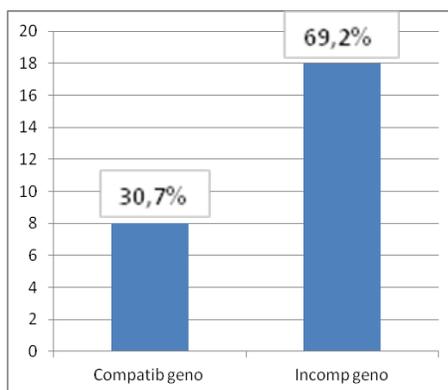


### 7.2.3. Compatibilidad haplotípica con diferencias genotípicas:

Al concentrarnos en los 31/39 (79%) pares de receptores y donantes con haplotipos compatibles (Bx-Bx y AA-AA) encontramos que aquellos con “compatibilidad Haplotípica Bx-Bx” (26/31; 83,8%) existía “incompatibilidad genotípica” del 69,2% (18/26) con compatibilidad genotípica del 30,7% (8/26 parejas) Grafica N°27. Es decir, que más de la mitad de las parejas con el mismo haplotipo (Bx-Bx) tenían diferencias genéticas de KIR.

**Grafica N° 27. Parejas con haplotipo compatible Bx-Bx pero con genotipos distintos.**

(n=26)



No encontramos diferencias genotípicas en las parejas compatibles en haplotipos AA; estas 5 parejas de receptores y donantes también lo eran en sus genotipos (genotipo 1:100% compatibilidad genotípica).

## 8. Evaluación de HLA como Ligando de KIR:

### 8.1. Pérdida o ausencia de Ligandos para KIR:

En los 39 pacientes evaluados se encontró ausencia de por lo menos 1 de los ligandos conocidos para KIR: 39/39 (100%).

En cuanto al estudio de los ligandos ausentes HLA A, se presentan en la tabla N°22 y HLA B (Bw4-Bw6) se muestran en la tabla N°23. Para HLA C se evidenciaron altos porcentajes de ausencia de los diferentes ligandos en todos pacientes. Por ejemplo en el caso del Cw18 se evidenció su ausencia en todos los pacientes del estudio. (tabla N°24).

**Tabla N°22. Frecuencia en la ausencia de ligandos HLA A en la población de estudio (n=39)**

Ligando ausente	N°	%
A3	33	84,6%
A11	37	94,8%

**Tabla N°23. Frecuencia en la ausencia de ligandos HLA B en la población de estudio (n=38)**

Ligando ausente	N°	%
Bw4	17	44,73%
Bw6	7	18,4%

**Tabla N°24. Frecuencia en la ausencia de ligandos HLA C en la población de estudio (n=39)**

<b>Ligando ausente</b>	<b>Fcia de la ausencia del ligando N°</b>	<b>%</b>
<b>Grupo 1</b>		
<b>Cw01</b>	30	76,9%
<b>Cw03</b>	26	66,6%
<b>Cw07</b>	26	66,6%
<b>Cw08</b>	38	97,4%
<b>Cw12</b>	35	89,7%
<b>Grupo 2</b>		
<b>Cw02</b>	36	92,3%
<b>Cw04</b>	34	87,17%
<b>Cw05</b>	35	89,7%
<b>Cw06</b>	35	89,7%
<b>Cw15</b>	36	92,3%
<b>Cw16</b>	35	89,7%
<b>Cw17</b>	38	97,4%
<b>Cw18</b>	39	<b>100%</b>

## **9. Evaluación de Recaídas, Fallecimientos y Supervivencia:**

### **9.1. Recaídas y fallecimientos asociados a distintas variables:**

Al realizar el análisis de recaídas como indicador clínico de alorreactividad y fallecimientos como un indicador clínico de duración de la supervivencia, a través del estudio de tablas cruzadas o de contingencia (las cuales nos permiten describir el comportamiento de los datos de dos o más variables

de acuerdo a la combinación o cruce de sus categorías con relación a las distintas variables del estudio) y a través de otro método estadístico como el ANOVA (que compara variables cualitativas con cuantitativas), no encontramos influencia de manera significativa sobre el comportamiento de las recaídas y los fallecimientos al asociarlos con los antecedentes de enfermedades crónicas en los pacientes, antecedentes de enfermedades inmunológicas, diagnóstico de las distintas malignidades hematológicas, número de recaídas previas al trasplante para cada enfermedad, tipo de trasplante, infecciones en el post-trasplante, EICH y combinación de haplotipos y genotipos KIR (haplotipos distintos, haplotipos igual y genotipo igual, haplotipos igual y genotipo distinto, agrupados de esta manera para distinguir el comportamiento de cada grupo genético según la variable evaluada). En este último grupo observamos que en números absolutos el grupo con haplotipos iguales pero genotipos distintos presentó menor número de recaídas y fallecimientos aunque sin diferencias significativas, probablemente por el número de la población total de estudio (Tabla N°25 y N°26). No se realizó este análisis para rechazo por tratarse de 1 solo caso. Se excluyeron 5 pacientes por ausencia de datos en la historia clínica sobre presencia o no de recaídas. (Anexo N°13 y N°14)

**Tabla N°25. Recaídas asociadas a grupos con similitud y diferencias en haplotipos y genotipos (n=35)**

<b>Recaída</b>	<b>Haplotipo igual y genotipo igual</b>	<b>Haplotipo igual y genotipo diferente</b>	<b>Haplotipo diferente</b>	<b>Total</b>
<b>Presente</b>	5	5	2	12
<b>Ausente</b>	6	<b>12</b>	5	23
<b>Total</b>	11	17	7	35

**Tabla N° 26. Fallecimientos asociados a grupos con similitud y diferencias en haplotipos y genotipos (n=35)**

<b>Fallecimientos</b>	<b>Haplotipo igual y genotipo igual</b>	<b>Haplotipo igual y genotipo diferente</b>	<b>Haplotipo diferente</b>	<b>Total</b>
<b>Presente</b>	4	5	4	13
<b>Ausente</b>	7	<b>12</b>	3	22
<b>Total</b>	11	17	7	35

## **9.2. Evaluación de Supervivencia y Recaída según Método Kaplan-Meier:**

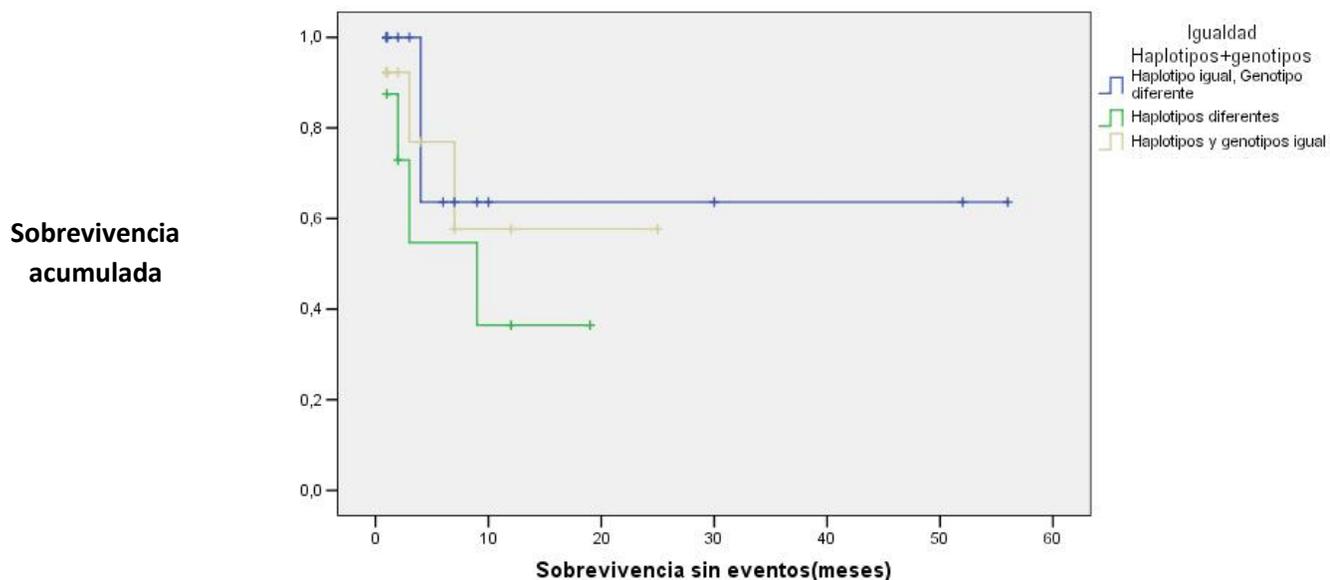
Utilizamos el método de Kaplan-Meier, que constituye un análisis de supervivencia que permite el cálculo de la probabilidad que un individuo sobreviva un período de tiempo determinado; ésta es una técnica no paramétrica que utiliza el tiempo de supervivencia exacto de cada individuo en lugar de agruparlos en intervalos de tiempo<sup>(44)</sup>.

Las parejas de pacientes y sus donantes fueron agrupadas según combinaciones genéticas en 3 grupos (haplotipo distintos, haplotipos y genotipos iguales, y haplotipos iguales con genotipo distinto) para facilitar el análisis posterior del modelo Gen-Gen KIR y compararlo al de Pérdida del ligando.

### **9.2.1. Supervivencia sin eventos en el post-trasplante según grupos genéticos:**

Al realizar el análisis de supervivencia a través del Método estadístico de Kaplan-Meier utilizado para mostrar las diferentes tendencias en el comportamiento de los grupos genéticos observamos que la supervivencia sin eventos para todo el grupo de pacientes fue en promedio de 32,4 meses, sin embargo, en el subgrupo de pacientes con haplotipo igual y genotipo diferente la tendencia fue a sobrevivir mayor tiempo sin eventos que el resto de los grupos (37,09 meses). Gráfica N°28 y Tabla N°27.

**Gráfico N° 28. Tendencia de Supervivencia sin eventos en el tiempo según distintos grupos genéticos.**



**Tabla N°27. Tiempo de Supervivencia sin eventos según grupos genéticos. (n=39)**

Grupos Genéticos	Media estimada (meses)	Error estándar	IC 95%
<b>Haplotipo igual y genotipo igual</b>	16,308	4,066	8,339-24,276
<b>Haplotipo igual y genotipo diferente</b>	<b>37,091</b>	7,542	22,308-51,873
<b>Haplotipos diferentes</b>	9,531	3,077	3,500-15,562
<b>Grupo General</b>	32,427	5,497	21,653-43,201

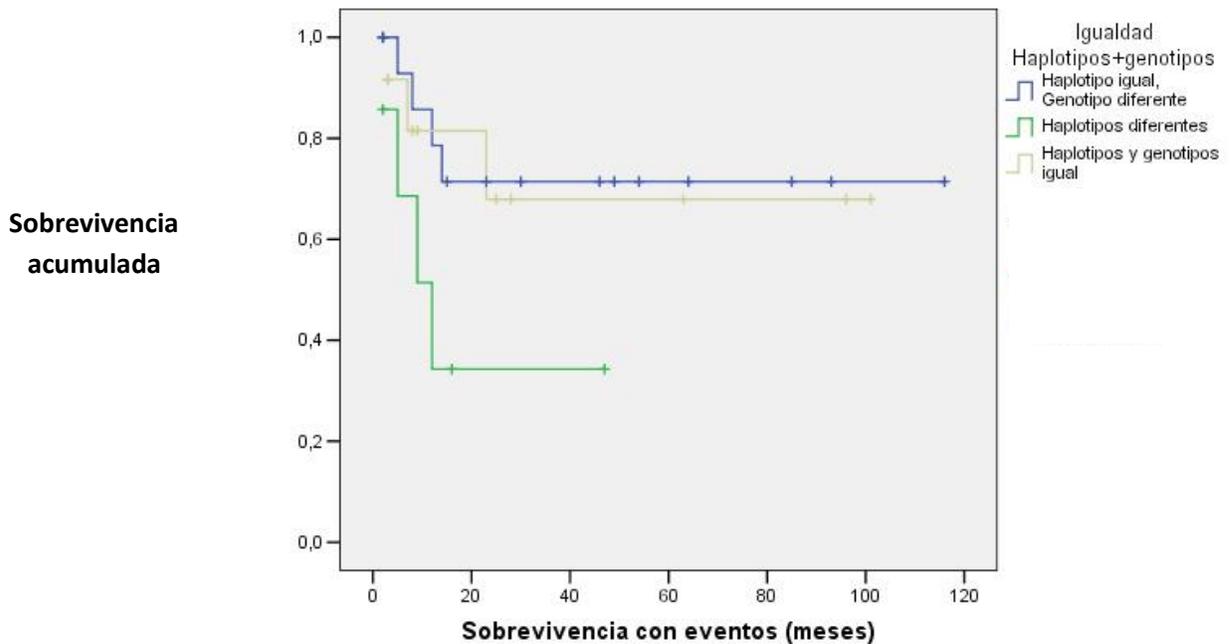
En los 3 grupos genéticos del estudio se evidenció que el primer año post-trasplante y particularmente los primeros 6 meses son críticos para la supervivencia sin eventos; sin embargo el

grupo de parejas con Haplotipo igual pero genotipo diferente presentó la mayor sobrevivencia acumulada sin eventos en el tiempo, al compararlo con el resto de los grupos genéticos.

**9.2.2. Sobrevivencia con eventos en el post-trasplante según grupos genéticos:**

Al observar el tiempo de sobrevivencia de los pacientes con diversos eventos (recaída, rechazo, reacción de injerto contra huésped e infecciones) encontramos que nuevamente el grupo de pacientes con haplotipos iguales pero genotipos diferentes sobrevivió más tiempo aún con los distintos eventos presentados (85,64 meses con IC95% de 61 a 111 meses) que el resto de los subgrupos e inclusive que el grupo en general (75,68 meses). Gráfica N°29 y Tabla N°28.

**Gráfico N° 29. Tendencia de Sobrevivencia con eventos en el tiempo según distintos grupos genéticos.**



**Tabla N°28. Tiempo de Supervivencia con eventos según grupos genéticos. (n=39)**

<b>Grupos Genéticos</b>	<b>Media estimada (meses)</b>	<b>Error estándar</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Haplotipo igual y genotipo igual</b>	72,583	13,443	45,443-99,724
<b>Haplotipo igual y genotipo diferente</b>	<b>85,643</b>	12,838	60,481-110,805
<b>Haplotipos diferentes</b>	20,857	7,811	5,548-36,167
<b>Grupo General</b>	75,681	9,713	56,643-94,718

En el gráfico N°29 también se aprecia que el primer año post-trasplante es crítico para todos los grupos con descenso rápido en la supervivencia acumulada en este período. Se evidencia que el grupo de parejas con haplotipo igual pero genotipo diferente presentó mayor supervivencia que el resto de los grupos, seguido por el grupo con haplotipos iguales. Llama la atención que el grupo con haplotipos y genotipos diferentes presentó menor supervivencia que el resto de los grupos, tomando en cuenta que se trata de pacientes que también presentan diferencias genéticas con sus donantes en el sistema KIR como ocurre con el primer grupo.

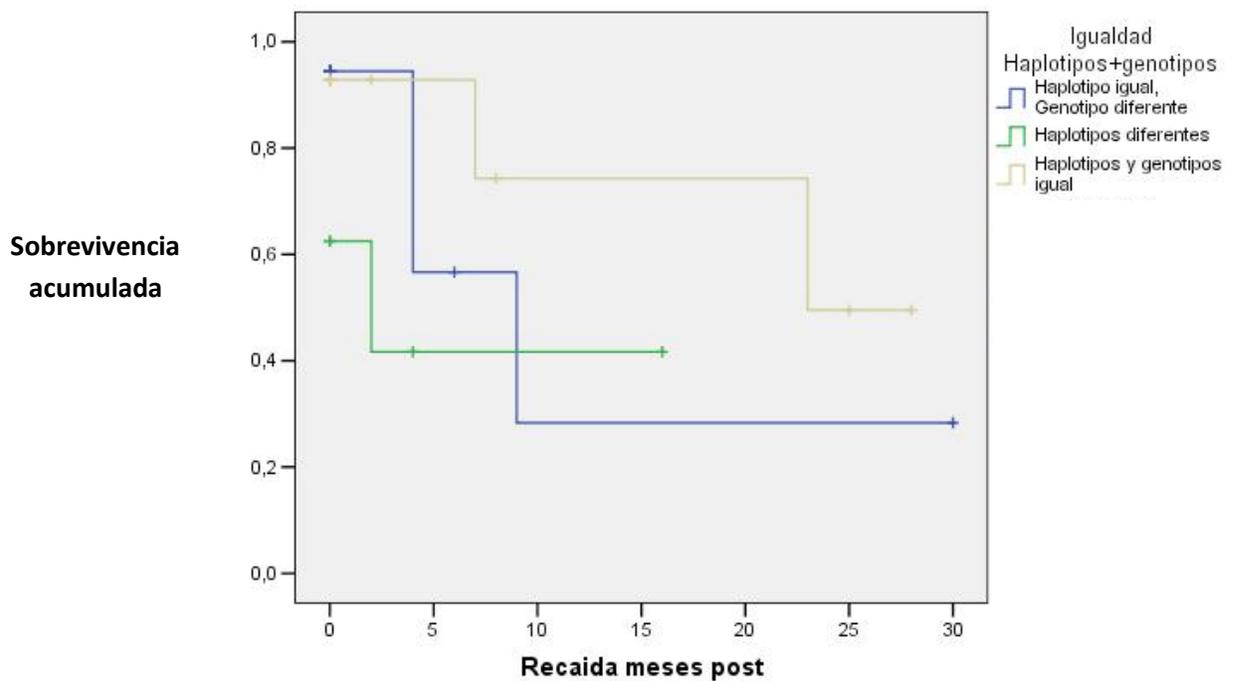
### **9.2.3. Recaídas en el post-trasplante según grupos genéticos:**

Se evidenció que los primeros 10 meses son críticos para las recaídas.

Al evaluar la tendencia a recaídas en el tiempo de los 3 grupos genéticos observamos que las recaídas son menores en el grupo de sobrevivientes con haplotipos iguales y genotipos diferentes,

seguidos del grupo con haplotipos distintos (ambos grupos considerados alorreactivos según el modelo Gen-Gen KIR por sus diferencias genéticas). En cambio el tercer grupo que sobrevivió con haplotipos y genotipos iguales presentó las mayores incidencias de recaída en el tiempo. (Gráfica N°30 y Tabla N°29).

**Gráfico N° 30. Tendencia de Supervivencia en el tiempo frente a las Recaídas según grupos genéticos**



**Tabla N° 29. Recaídas en el tiempo según grupos genéticos. (n=39).**

<b>Grupos Genéticos</b>	<b>Media estimada (meses)</b>	<b>Error estándar</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Haplotipo igual y genotipo igual</b>	20,862	3,705	13,600-28,124
<b>Haplotipo igual y genotipo diferente</b>	<b>12,561</b>	5,339	2,097-23,025
<b>Haplotipos diferentes</b>	<b>7,083</b>	3,072	1,063-13,104
<b>Grupo General</b>	16,095	3,219	9,785-22,405

## DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer reporte Venezolano de los dos sistemas más polimórficos del genoma humano, los genes KIR y HLA, en una población de pacientes especiales representada por los enfermos con patologías hematológicas malignas, sometidos a trasplante de células madres hematopoyéticas, como única opción probable de curación.

En nuestra investigación evaluamos un grupo de 40 muestras de sangre criopreservadas en el Laboratorio de Inmunogenética del Instituto de Inmunología de la UCV (previa aprobación del Comité de Bioética) pertenecientes a pacientes receptores de trasplante alogénico de células madres hematopoyéticas (y las 40 muestras de sangre de sus donantes correspondientes) no depletadas de células T, de ambos sexos, 95% de ellos nacidos en Venezuela (se desconoce si son venezolanos de tercera generación por no reportarse en las historias clínicas revisadas), con hermanos HLA idéntico como donantes (con un solo caso de gemelo probablemente singénico). Los trasplantes fueron realizados por el equipo de Hemato-oncólogos del Hospital de Clínicas Caracas en el período comprendido entre el año 2000 al 2010 en pacientes con distintas malignidades hematológicas de mal pronóstico, tales como:

Leucemias (85% de los pacientes del estudio) distribuidas en Leucemias mieloides 45% (agudas<sup>(45)</sup> 20% y crónicas 25%<sup>(46)</sup>) y Leucemias linfoblásticas agudas<sup>(47)</sup> (40% de los pacientes),

Síndrome mielodisplásico<sup>(48)</sup> (10% de los pacientes) y

Linfoma no Hodgkin<sup>(49)</sup>; (5% de los pacientes), enfermedades que han sido evaluadas en conjunto en otros estudios<sup>(13,32)</sup>.

La edad de los pacientes se encontraba en rangos de 4 a 60 años, siendo menores de 18 años para el momento del trasplante el 40% de los casos y mayores de 18 años el 60% de los casos, con una edad

media de 27 años aproximadamente; estudios previos han sido realizados en grupos similares de pacientes con amplios rangos etarios<sup>(13, 28, 32)</sup>.

Cuando evaluamos los estudios realizados en el pre-trasplante a receptores y donantes, encontramos que el estudio de histocompatibilidad (HLA) realizado en nuestro centro (Instituto de Inmunología de la UCV) del donante hermano(a) compatible, fue igual en todas las parejas. Actualmente en la Unidad de Trasplante de Médula Ósea del Hospital de Clínicas Caracas solo se trasplantan parejas donante-receptor HLA idénticos, tanto para HLA clase I como clase II.

Además, el 80% de las parejas fueron compatibles en su sistema ABO y el 100% lo fue en el factor RH y aunque las incompatibilidades en estos sistemas no contraindican este tipo de trasplantes (células madres hematopoyéticas) pueden contribuir a mayor morbilidad luego del mismo, por lo que en nuestro grupo de estudio, este sistema no influyó en la morbilidad post-trasplante.

En relación al esquema de acondicionamiento, el 90% aproximadamente (87,5%) recibió esquema Mieloablatoivo y solo un 10% aproximadamente de tipo no Mieloablatoivo; estos últimos correspondieron a 4 adultos de 40-60 años con mayor riesgo de morbilidad relacionada a sus condiciones generales y grupo etario, de los cuales 3 presentaban Síndrome Mielodisplásico (los SMD se presentan predominantemente en pacientes de edad avanzada generalmente mayores de 60 años<sup>(48)</sup>), y un paciente con LLA; el hecho que el 90% aproximadamente recibiera esquema Mieloablatoivo favorece la uniformidad del grupo e indica que el régimen aplicado en la preparación de los pacientes inducía aplasia medular.

En cuanto a la obtención del injerto por parte del equipo de trasplante del Hospital de Clínicas Caracas, se realizó a partir de Médula Ósea o de Sangre Periférica, según el criterio del médico para cada caso; sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre la frecuencia

de realización de una técnica u otra (M.O: 45% y SP: 52,5%), así como tampoco se observó que influyera en la supervivencia post-trasplante.

La cantidad de células CD34+ infundidas a los pacientes o dosis del injerto al momento del trasplante se encontró en rangos de  $>2$  a  $<8 \times 10^6$  CD34+ en 80% de los casos, sin que exista una estandarización definida a nivel internacional sobre la cantidad de CD34+ que debe ser infundida para favorecer el implante; encontramos en un estudio Asiático dosis media de CD34+ de M.O en  $2,60 \times 10^8$  y desde SP de  $6,64 \times 10^6$  <sup>(50)</sup> similares a las utilizadas en nuestros pacientes; a nivel nacional se prefiere someter al paciente al trasplante si se obtienen  $>2 \times 10^6$  células CD34+ a partir de su donante ( el uso de dosis de  $2 \times 10^6$  células CD34+ se ha descrito como un factor que disminuye la posterior EICH<sup>(51)</sup>) y en más del 60% solo se necesitó realizar un único procedimiento para la colecta de las células madres hematopoyéticas, las cuales se infundieron al paciente el mismo día de su obtención evitándose la criopreservación del injerto. Debe destacarse que no obtuvimos en la mayoría de los casos datos acerca del marcaje celular de CD3 y CD45, conteo total de monocitos y NK, es decir, otros datos sobre la constitución del injerto alogénico que permitieran mayor análisis, ya que existen reportes que indican que una alta dosis de células NK en el injerto se asocia a menor incidencia de recaídas, pero dosis elevadas de células T se relacionaron a mayor recaída<sup>(52)</sup>, porque se especula que las células T podrían en algunos casos afectar la reconstitución de NK.

Dentro de las complicaciones inherentes al trasplante evaluamos la presencia de Mucositis, la cual se presentó en 40% de los casos, teniendo menor frecuencia que las descritas en la literatura, donde se reporta que afectan al 75% de los pacientes con QT a altas dosis y TMO<sup>(53)</sup>. Es importante señalar que la Mucositis se presenta a consecuencia del proceso inflamatorio causado por los tratamientos antineoplásicos como la quimioterapia, radioterapia y el propio T.M.O, además de infecciones oportunistas en el tejido mucoso, que sabemos es una gran puerta de entrada de estos agentes.

Tomando en cuenta que los tratamientos están protocolizados a nivel mundial así como las técnicas para el trasplante, es probable que la menor incidencia de este cuadro en nuestra población se asocie al hecho que los trasplantes se realizaron entre individuos HLA idénticos, efectividad de la profilaxis infecciosa asociada al cuidado del paciente y al número de individuos evaluados en este estudio.

En la evolución general de los pacientes en el post-trasplante encontramos EICH en el 40% de los casos aproximadamente, cónsono con el 26 al 76% <sup>(3,8)</sup> descrito en la literatura. Por otra parte, en nuestro grupo se presentó EICH aguda en 37,5% (similar a lo descrito en otros trabajos, 35-80% <sup>(8)</sup>) y EICH crónica en 50% (superior al 25% descrito en la literatura <sup>(8)</sup>, y que podría asociarse a la disminución de la intensidad de los regímenes inmunosupresores en la fase crónica y a la reconstitución inmunológica del paciente a partir del injerto recibido).

La afectación de órganos en la EICH aguda fue de intestino, hígado y multiorgánica (piel, intestino e hígado); la frecuencia de casos fue igual a 2 casos por cada grupo. En aquellos con EICH crónica el 25% presentó afectación de piel, 25% multiorgánica (piel, hígado e intestino) y el 50% afectación hepática (órganos comúnmente afectados en este tipo de eventos <sup>(51)</sup>). Llama la atención que el hígado tuvo la mayor afectación en la EICHc, más aún si observamos que los casos con afectación multiorgánica incluyeron también al tejido hepático, por lo que el hígado se afectó en 75% de los pacientes con EICHc, cuando se describe en la literatura que el órgano con mayor afectación en la fase crónica es la piel <sup>(54)</sup>, la cual en nuestro grupo fue del 50% (tomando en cuenta que se presentó en 25% de los pacientes y formando parte de afección multiorgánica en otro 25%); es importante destacar la delgada línea que existe entre el tratamiento profiláctico de la EICH y la presencia “deseable” del mismo, por su efecto de injerto contra leucemia o contra enfermedad. Además debemos recordar que los trasplantes en nuestro país no son depletados de células T, lo que podría contribuir en el ataque inicial de tejidos. Sin embargo debe mantenerse o intensificarse el control del ataque a estos órganos

(especialmente el tejido hepático) no solo en los primeros 100 días sino luego en la etapa crónica post-trasplante.

En los reportes del grado de severidad de la EICH (lo cual es determinado por clasificaciones internacionales) se encontró que más del 60% eran grado II-III de severidad, lo cual es importante ya que artículos que evalúan severidad<sup>(55)</sup> y manejo de EICH analizan pacientes con grados mayores a II, debido a que la sobrevivencia a 5 años post-trasplante varía según el grado, describiéndose del 70% para grado I, pero del 50% y 20% para grados II y III-IV respectivamente<sup>(51)</sup>, además que indica una importante reacción de injerto contra huésped y probablemente contra enfermedad.

En cuanto al Rechazo al injerto, solo se presentó en un (1) paciente, por lo que al tratarse de un dato escaso, tal vez por nuestra población total, no pudo ser analizado en la sobrevivencia general del grupo. Sin embargo, ésto es de esperarse al considerar que los tratamientos aplicados a los pacientes en el régimen de acondicionamiento fueron del tipo mieloablativo en casi el 90% del grupo.

Las recaídas (hematológicas y extramedulares) ocurrieron en 35% de nuestros pacientes, en menor frecuencia que el 50% descrito en la literatura mundial<sup>(5)</sup>, probablemente porque la mayoría de nuestros pacientes fue manejado con protocolos mieloablativos. Otros factores podrían ser que el trasplante se realiza sin depleción de células T, el grado de severidad del EICH fue elevado, la mayoría de las parejas presentó diferencias genéticas en su sistema KIR y todos tenían ausencia de por lo menos uno (1) de los ligandos conocidos de KIR. La mayor parte de estas recaídas (64%) ocurrió en el primer año post-trasplante, por lo que sigue siendo crítico el manejo cercano de los pacientes en este periodo, que se corrobora con la duración de la remisión de los pacientes que posteriormente presentaron recaídas, la cual tuvo un promedio de 12 meses, aunque con rangos de 2 a 30 meses.

Con respecto a las muertes ocurridas para el momento de corte de las historias clínicas se evidenció que el 35% había fallecido (permanecían vivos el 52,5% y se desconocía el estatus de 12,5%).

Entre las causas de muerte encontramos que el 21% falleció por recaídas y el 29% por recaída extramedular con sepsis. Al sumar estos 2 grupos encontramos 50% de pacientes con muertes asociadas a recaídas, valor que es mayor a lo descrito en la literatura (34%<sup>(51)</sup>, 35,5%<sup>(56)</sup>). Llama la atención que aunque nuestro grupo presentó “menor tasa de recaída” que la descrita en la literatura, los pacientes que la presentaron tenían “mayor mortalidad” por esta causa en el primer año post-trasplante. Si sumamos los pacientes fallecidos por sepsis (36%) más las muertes por sepsis y recaídas extramedulares (29%) encontramos que 60% de las muertes se asociaron a sepsis (superior a lo descrito en otros trabajos (17%<sup>(51)</sup>).

Sin embargo encontramos menor frecuencia de muerte para el resto de los eventos en nuestro grupo: defunciones por EICH 7% y toxicidad medicamentosa 7% (al compararlo con lo descrito en otros centros para EICH de 15% y de 14% para toxicidad medicamentosa<sup>(51)</sup>). Debemos recalcar que el estudio previamente citado presentado por De Wire<sup>(51)</sup> en el St. Jude Children’s Research Hospital, mostró un seguimiento más prolongado de los pacientes (1996-2000), mayor población y características distintas de los trasplantes, lo cual puede influir en el resultado distinto.

#### **-Estudio de Genes KIR:**

Cuando evaluamos las 40 parejas encontramos 2 genotipos no tipificados hasta la fecha en la página [allelesfrequencies.net](http://allelesfrequencies.net) (uno pertenece a un donante y el otro a un receptor, sin ser éstos una pareja) los cuales fueron confirmados en una segunda determinación por la técnica SSP, ambos pertenecientes al haplotipo Bx<sup>(43)</sup> por lo que no habían sido reportados hasta ahora en la literatura mundial.

#### **- Reporte Nacional de genotipos encontrados en el estudio:**

En este estudio encontramos 10 genotipos del haplotipo Bx (202,63,80,106,296,17,73,23,38,14 “entre donantes y receptores”) descritos a nivel mundial pero sin referencias en Venezuela (según la

pagina web [allelefrequencies.net](http://allelefrequencies.net)) así como 2 genotipos del haplotipo AA (156 y 203) no reportados antes en nuestro país (Tabla N°30 y 31).

Debemos recordar que se desconoce si los genotipos descritos en este estudio por primera vez en individuos nacidos en Venezuela pertenecen a mestizos de tercera generación (con excepción de la paciente R23 nacida en Siria). Por lo que en nuestra investigación aportamos probablemente nuevos datos sobre la constitución genética de nuestro país y a nivel mundial en relación al sistema KIR, sobre todo tomando en cuenta que en Venezuela encontramos una gran mezcla étnica y diversidad genética no explorada aún en su totalidad.

**Tabla N°30. Genotipos KIR de receptores, reportados y no reportados  
previamente en Venezuela:**

Receptores	ID Genotipo	Reporte Venezolano
R1	2	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R2	202	<b>No reportado previamente</b>
R3	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R4	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R5	63	<b>No reportado previamente</b>
R6	11	Warao, mestizo
R7	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R8	4	bari,yucpa, mestizo
R9	2	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R10	7	Mestizo
R11	81	Mestizo
R12	4	bari,yucpa, mestizo
R13	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R14	4	bari,yucpa, mestizo
R15	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R16	156	<b>No reportado previamente</b>
R17	2	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R18	3	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R19	3	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R20	80	<b>No reportado previamente</b>
R21	5	Warao, mestizo
R22	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R23	203	<b>No reportado previamente</b>
R24	5	Warao, mestizo
R25	106	<b>No reportado previamente</b>
R26	4	bari,yucpa, mestizo
R27	2	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R29	71	Mestizo
R30	292	<b>No reportado previamente</b>
R31	4	bari,yucpa, mestizo
R32	6	Mestizo
R33	68	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R34	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R35	2	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R36	18	Mestizo
R37	7	Mestizo
R38	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R39	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
R40	5	Warao, mestizo

**Nota:** No se incluye al paciente R28 por tratarse de genotipo no reportado en la página [www.allelefrequencias.net](http://www.allelefrequencias.net). El genotipo 203 correspondió a la paciente R23 nacida en Siria.

**Tabla N°31. Genotipos KIR de donantes, reportados y no reportados previamente en Venezuela:**

Donantes	ID Genotipo	Reporte Vzla
D1	4	bari,yucpa, mestizo
D2	2	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D3	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D4	17	<b>No reportado previamente</b>
D5	4	bari,yucpa, mestizo
D6	5	Warao, mestizo
D7	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D9	80	<b>No reportado previamente</b>
D10	7	Mestizo
D11	73	<b>No reportado previamente</b>
D12	23	<b>No reportado previamente</b>
D13	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D14	9	warao, mestizo, bari
D15	30	mestizo
D16	4	bari,yucpa, mestizo
D17	2	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D18	106	<b>No reportado previamente</b>
D19	9	warao, mestizo, bari
D20	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D21	38	<b>No reportado previamente</b>
D22	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D23	33	mestizo
D24	63	<b>No reportado previamente</b>
D25	68	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D26	4	bari,yucpa, mestizo
D27	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D28	69	bari, mestizo
D29	71	Mestizo
D30	12	Mestizo
D31	4	bari,yucpa, mestizo
D32	6	Mestizo
D33	68	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D34	14	<b>No reportado previamente</b>
D35	18	Mestizo
D36	2	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D37	7	Mestizo
D38	3	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D39	1	Bari, Warao, Yucpa, Mestizo
D40	5	Warao, mestizo

**Nota:** No se incluye al Donante D8 por tratarse de genotipo no reportado en la página [www.allelrequencies.net](http://www.allelrequencies.net). La donante D23 corresponde a un genotipo descrito en población mestiza Venezolana, a pesar de tratarse de hermana de paciente R23 nacida en Siria.

En el grupo de donantes encontramos mayor diversidad de genotipos distintos en comparación con los pacientes (23 vs 19) aunque en ambos grupos el genotipo más frecuente fue el 1 (perteneciente al haplotipo AA). Esto último coincide con lo descrito en estudios de población mestiza venezolana sana<sup>(18)</sup>. Es interesante que los pacientes presenten menos diversidad genética que sus hermanos donantes, porque ésto podría traducirse en menor diversidad en la expresión clonal de KIR sobre la célula NK.

En el estudio genético de los haplotipos KIR un aspecto interesante fue que aunque las parejas de hermanos HLA idénticos tenían en su mayoría “haplotipos KIR iguales” (79%), es decir Bx-Bx o AA-AA, la mayoría presentó “diferencias genéticas”, es decir, genotipos incompatibles (69,2%) y todos los que tenían estas diferencias pertenecían al haplotipo Bx-Bx. Estos datos nos permitieron separar a las parejas en 3 grupos: Haplotipo y genotipo igual, Haplotipo diferente (y por lo tanto genotipo diferente) y parejas con Haplotipo igual pero genotipo diferente para su análisis posterior.

Aunque fue evidente que en ambos grupos (donantes y pacientes) el haplotipo Bx fue el más frecuente, se observó mayor presencia del mismo en la población de donantes en comparación con los pacientes (sin diferencias significativas) es decir, mayor número de genes KIR activadores en la población de donantes sanos que en sus hermanos enfermos receptores, lo que en teoría pondría en ventaja a los donantes hermanos en el control de tumores en comparación con los pacientes, los cuales se verían beneficiados de la reconstitución post-trasplante de sistemas de inmunovigilancia iguales o similares a los de sus hermanos sanos.

De igual forma observamos mayor frecuencia del haplotipo AA (no significativa) en el grupo de pacientes en relación con los donantes (23% vs 20%). Esto resulta interesante ya que el haplotipo AA se asocia a mayor número de KIR inhibitorios, sugiriendo la presencia de genes inhibitorios KIR en la población de pacientes que pueden asociarse a menor alorreactividad de la célula NK y a falla en el

sistema de inmunovigilancia tumoral en los pacientes. Esto ha sido reportado en otros estudios donde la mayor presencia de KIR inhibitorios se encuentra en pacientes con distintas malignidades hematológicas, en comparación con población sana<sup>(23, 57)</sup>. Además, el hecho que los pacientes presenten más haplotipos AA (más homogéneos en su constitución KIR) podría asociarse a la menor variabilidad en los perfiles genotípicos descritos previamente.

Al evaluar el sistema HLA como ligando de KIR encontramos que en todos los pacientes había ausencia de por lo menos uno (1) de los ligandos HLA conocidos para KIR, situación descrita para el modelo predictor de alorreactividad de pérdida de ligando<sup>(13)</sup>. Según este modelo, debería existir alorreactividad en todos los trasplantes realizados y prevenirse, por tanto, la recaída en todos los casos. Sin embargo, ésto no ocurrió: 35% de nuestros pacientes presentaron recaídas. Pero, si tomamos en cuenta que la frecuencia de las recaídas en nuestro grupo fue menor que la descrita en la literatura, no podemos descartar por completo a este modelo como predictor de alorreactividad, más aún cuando nuestros trasplantes no son depletados de células T y esto último podría afectar la reconstitución de la célula NK.

Cuando realizamos el análisis de recaída (la cual es una variable que a nivel clínico puede estar influenciada por la alorreactividad) y los fallecimientos (como indicador clínico de duración de sobrevivencia) utilizando métodos como las tablas cruzadas (de contingencia) y ANOVA, no encontramos relación de estas variables con otros factores como: antecedentes de enfermedades crónicas, diagnóstico de malignidades hematológicas, recaídas en el pre-trasplante, infecciones o EICH. Sin embargo, al evaluar los grupos genéticos de las parejas (Haplotipos y genotipos iguales, Haplotipos y genotipos diferentes y haplotipos iguales con genotipos diferentes) y a pesar de no encontrar influencia significativa, podemos observar en las tablas de valores absolutos que el grupo con haplotipos iguales y genotipos diferentes presentó menor recaída y menor número de muertes en

relación al resto de los grupos; es probable que el número de nuestra población afectara la significancia de esta última variable.

En el análisis realizado a través del método Kaplan-Meier para sobrevivencia, agrupamos a los pacientes según sus compatibilidades haplotípicas y genóticas en 3 grupos: Haplotipo igual y genotipo igual, Haplotipos diferentes, Haplotipo igual y genotipo diferente: Esto nos permitió observar las tendencias de sobrevivencia en el tiempo para cada grupo y evidenciamos que el grupo con haplotipos iguales y genotipos diferentes presentó mayor sobrevivencia sin eventos, mayor sobrevivencia con eventos y menor recaída en el tiempo que el resto de los grupos. El tiempo de sobrevivencia sin eventos y con eventos fue superior para el grupo considerado alorreactivo por el modelo Gen-Gen KIR debido a sus diferencias genéticas, seguido por el grupo no considerado alorreactivo (Haplotipos y genotipos iguales). Esto podría explicarse porque al evaluar sobrevivencia general post-trasplante existen factores no relacionados a alorreactividad, como la igualdad del sistema HLA en nuestros pacientes, que disminuyen las comorbilidades del post-trasplante y aumentan la sobrevida, es decir, no solo la recaída afecta la sobrevivencia sino el resto de los eventos presentados en el post-trasplante. Además, el grupo con haplotipos distintos a pesar de considerarse también alorreactivo, era el más pequeño numéricamente y existían donantes haplotipo AA para receptores haplotipo Bx, por lo que la reconstitución de los repertorios KIR en estos pacientes conduciría en teoría a haplotipos inhibidores que afectarían la inmunovigilancia tumoral.

En las tablas de sobrevivencia sin eventos y con eventos (no se muestra la curva en las gráficas) se observa a todo el grupo en conjunto (el cual corresponde también a los pacientes con ausencia de ligando) y evidenciamos que la sobrevivencia en el tiempo de este grupo también es elevada y es solo superada por el grupo con haplotipos iguales y genotipos diferentes.

Al estudiar específicamente la alorreactividad a través de la presencia de recaídas por el método de Kaplan-Meier, observamos nuevamente que el grupo con haplotipos iguales y genotipos diferentes presentó la menor incidencia de recaídas en comparación al resto de los grupos evaluados. Aquí llama la atención que el resto de las curvas se modificaron en relación al análisis de supervivencia sin eventos y con eventos, ya que en este caso el grupo con haplotipos distintos (también considerado alorreactivo por los 2 modelos de estudio) presentó menor recaída que aquellos iguales en haplotipos y genotipos, estos últimos con las mayores incidencias de recaídas en el tiempo. Es probable que los grupos considerados alorreactivos puedan influir clínicamente en el control de recaídas y que en cambio el grupo con igualdad genética, no solo en KIR sino en HLA, se comporte en forma similar a los gemelos idénticos, en los cuales las recaídas son más frecuentes<sup>(51)</sup> ya que los pacientes reconstituyen el mismo sistema de inmunovigilancia que falló en evitar o en controlar la enfermedad maligna que padecieron. Además, el grupo con menor recaídas en el tiempo estaba constituido solo por donantes y pacientes del haplotipo Bx, es decir, que no hubo reconstitución de repertorios KIR con predominio de inhibidores y está descrito que los donantes Bx son mejores que los AA en este sentido<sup>(13)</sup>. Otro punto interesante es que la alorreactividad se ha asociado en algunos estudios<sup>(11)</sup> a menor rechazo al injerto, por lo que tomando en cuenta que la mayoría de las parejas tenían diferencias en su sistema KIR, resulta interesante que solo un (1) paciente presentara rechazo al injerto en nuestro estudio.

### **Asociación de KIR y enfermedad:**

Al comparar nuestros resultados con los publicados en diferentes trabajos donde se realiza asociación de KIR y enfermedad encontramos:

1. Estudio publicado	Hallazgo del estudio
<i>Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. Leukemia. 2004; 18:2002-7<sup>(21)</sup></i>	Mayor susceptibilidad a Leucemias en pacientes con presencia de KIR2DL1, 2DL2 y 2DL3

**Comentario:** En nuestro estudio existen 34 pacientes con diagnóstico de Leucemias (linfoblásticas y mieloides) de las cuales el 97,5% presentó el 2DL1; 53% se asociaron a la presencia del gen KIR 2DL2 y el 92,5% presentó el 2DL3, lo cual coincide con el estudio citado. Sin embargo, al evaluar a sus donantes encontramos valores similares: 2DL1 en 97,5% igual que los pacientes, el 2DL2 en 57,5%, más frecuente que en los pacientes y 2DL3 en 92,5%, igual que los pacientes. Por lo que no podemos asegurar con nuestros datos que estos grupos de genes específicos aumenten la susceptibilidad a leucemias.

2. Estudio publicado	Hallazgo del estudio
<i>Nowakowski GS, Morice WG, Phyliky RL, Li CY y Tefferi A. Human leucocyte antigen class I and killer immunoglobulin-like receptor expression patterns in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. Br J Haematol. 2005; 128(4):490-2<sup>(58)</sup></i>	Las enfermedades Linfoproliferativas se asocian a incompatibilidad de ligandos para KIR

**Comentario:** En nuestro estudio no hay pacientes con incompatibilidad de ligandos HLA porque todos los trasplantes se realizaron entre individuos hermanos HLA idénticos, razón por la que no evaluamos el Modelo alorreactivo de Incompatibilidad de Ligandos; por lo tanto, las enfermedades

linfoproliferativas presentadas en los pacientes de nuestra cohorte no pueden explicarse por esta vía. Probablemente habría que realizar estudio de HLA por alta resolución.

3. Estudio publicado	Hallazgo del estudio
<p>- Torres-García D, Barquera R y Zuñiga J. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. <i>Rev Inst Nal Enf Resp Mex.</i> 2008; 21(1). 57-65<sup>(57)</sup></p> <p>- Shahsavari F, Tajik N, Entezami KZ, Fallah Radjabzadeh M, Asadifar B, Alimoghaddam K et al. KIR2DS3 is associated with protection against acute myeloid leukemia. <i>Iran J immunol.</i> 2010; 7 (1):8-17<sup>(23)</sup></p>	<p>Mayor frecuencia significativa de KIR inhibitorios en pacientes con LMA y LLC</p>

**Comentario:** En nuestro estudio también encontramos que los pacientes tenían mayor frecuencia de haplotipos inhibidores (27,5%) que los donantes (17,5%), aunque no fue significativa la diferencia, probablemente por el número de nuestra población total.

4. Estudio publicado	Hallazgo del estudio
<p>- Shahsavari F, Tajik N, Entezami KZ, Fallah Radjabzadeh M, Asadifar B, Alimoghaddam K et al. KIR2DS3 is associated with protection against acute myeloid leukemia. <i>Iran J immunol.</i> 2010; 7 (1):8-17<sup>(23)</sup></p>	<p>Menor Frecuencia de KIR2DS3 en LMA</p>

**Comentario:** Encontramos baja presencia del 2DS3 en todo el grupo general de pacientes independientemente del diagnóstico, es decir, 22,5% de los pacientes presentaron el gen KIR 2DS3, pero observamos el mismo porcentaje en sus hermanos donantes sanos. Sin embargo, cuando revisamos el grupo de pacientes con LMA evidenciamos menor frecuencia (12,5%) que el grupo general de pacientes y de donantes. Al observar lo anterior, realizamos el mismo cálculo para otra enfermedad como la LMC y encontramos una frecuencia del 50% para el KIR2DS3, por lo que podemos decir que en nuestra población de pacientes el 2DS3 fue menos frecuentes en el grupo con LMA, al igual que el trabajo citado.

5. Estudio publicado	Hallazgo del estudio
<p><i>Izabela Nowak, Edyta Majorczyk, Andrzej Wis´niewski, Andrzej Pawlik, Maria Magott-Procelewska, Ewa Passowicz-Muszyn´ ska et al. Does the KIR2DS5 Gene Protect from Some Human Diseases?. Plos One. 2010; 5(8) 1-6 <sup>(59)</sup></i></p>	<p>Aparente efecto protector de 2DS5 en diversas condiciones clínicas autoinmunes, trasplante de órganos y ginecológicas.</p>

**Comentario:** Observamos que un poco más de la mitad de nuestros pacientes carecían del 2DS5 (58,9%), pero en los donantes sanos el valor fue similar (55%) por lo que no podemos afirmar que tenga efecto protector para las enfermedades estudiadas en nuestro trabajo, a diferencia de lo que se describe para endometriosis, espondilitis anquilosante y rechazo agudo en trasplante renal.

6. Estudio publicado	Hallazgo del estudio
<p><i>Scquizzato E, Teramo A, Miorin M, Facco M, Piazza F, Noventa F et al. Genotypic evaluation of killer immunoglobulin-like receptors in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. Leukemia. 2007; 21(5):1060-9 <sup>(60)</sup></i></p>	<p>Los genes KIR2DL5A y 2DL5B fueron más frecuentes en pacientes con enfermedad linfoproliferativa de linfocitos granulares</p>

**Comentario:** Aunque el estudio citado evaluó un tipo específico de enfermedad linfoproliferativa, decidimos compararlo con nuestra población general y no observamos que la frecuencia en nuestros pacientes fuera elevada (2DL5A: 37,5% y 2DL5B: 25%) incluso fue similar a los donantes sanos (2DL5A: 45% y 2DL5B: 17,5%).

## CONCLUSIONES

1. El modelo Gen-Gen KIR resultó mejor predictor de alorreactividad que el modelo de Pérdida del Ligando.
2. Las parejas de donantes y receptores con haplotipo activador (Bx) y distintos genotipos presentaron la mayor Supervivencia sin eventos, Supervivencia con eventos y menor Recaída en el tiempo.
3. Los individuos sanos presentaron mayor frecuencia de haplotipos con KIR activador y los pacientes más frecuencia de haplotipos con KIR inhibidor.
4. Los individuos sanos presentaron mayor diversidad en sus perfiles genotípicos KIR que los pacientes.
5. Dos genotipos KIR aparentemente sin publicaciones a nivel mundial se reportaron por primera vez en este estudio.
6. Diez (10) genotipos pertenecientes al haplotipo Bx y uno (1) perteneciente al haplotipo AA (ya que el otro genotipo del haplotipo AA pertenecía a nacida en Siria) se reportan por primera vez en nacidos en Venezuela en nuestro estudio.

7. Las recaídas y las infecciones son la principal causa de muerte de los pacientes con malignidades hematológicas sometidos a trasplante alogénico HLA idéntico, no depletado de células T, bajo condiciones de mieloablación en Venezuela.
  
8. La vía de obtención de células madres hematopoyéticas desde sangre periférica o desde medula ósea no influyó sobre la sobrevivencia ni evolución durante el post-trasplante.
  
9. El rechazo al injerto es un evento poco frecuente en receptores de trasplante de células madres hematopoyéticas para malignidades hematológicas en Venezuela.

## RECOMENDACIONES

1. Continuar y profundizar la línea de investigación de KIR y NK asociado a cáncer y trasplante en el Instituto de Inmunología de la UCV, con miras a aumentar la data de este estudio y evaluar otros modelos como Trasplante de Riñón especialmente asociado a cáncer renal, en vista de realizarse también en nuestro centro las pruebas pre-trasplante de esta población de pacientes.
2. Realizar a las futuras parejas de donantes y receptores de trasplante de células madres hematopoyéticas que acudan al Instituto de Inmunología estudios regulares de HLA C y KIR.
3. Sugerir en aquellos casos en los cuales se disponga, el uso de donantes HLA idénticos con haplotipo activador (Bx) y diferencias genéticas del sistema KIR en relación a los receptores de trasplante para enfermedades hematológicas malignas.
4. Proponemos (al contar con mayor población de pacientes) profundizar el análisis de este estudio y del modelo Gen-Gen KIR con la evaluación del comportamiento post-trasplante según las combinaciones de Genotipos específicos entre donantes y receptores, más allá de los haplotipos.
5. Repetir el estudio del genotipo KIR a las 2 muestras de sangre que resultaron no reportadas en la literatura mundial, a través de técnicas distintas a la usada en este estudio, con el fin de corroborar estos resultados.

6. Sugerimos verificar el status de Venezolano de Tercera generación en los pacientes y donantes que resultaron con genotipos KIR no descritos previamente en Venezuela, para formalizar la presencia de estas combinaciones en el perfil genético del mestizo Venezolano. Así como continuar la tipificación genética de KIR en la población Venezolana que permita determinar más perfiles genéticos no descritos aún en nuestro país para este sistema.

7. Realizar evaluación de los otros 2 modelos predictores de alorreactividad de NK, para compararlos con los resultados obtenidos en nuestro estudio, a través del uso de estuches de alta resolución para HLA que permitan distinguir diferencias alélicas entre las parejas de donantes y receptores para el modelo de Incompatibilidad de Ligando y realizar estudios celulares sobre la NK de donantes con realización del marcaje de los receptores KIR expresados en su superficie con el fin de asociarlo al HLA del paciente y evaluar el modelo de Ligando-Receptor.

8. Planteamos la realización de estudios funcionales de la célula NK de donantes, en ambientes o sistemas que permitan enfrentarla a tejido tumoral y visualizar este posible ataque a través de microscopia confocal. La selección de esta célula NK podría hacerse de pacientes con haplotipo activador y diferencias genéticas de KIR con el paciente correspondiente al tejido tumoral.

9. Para futuros estudios se sugiere recolectar la data completa de las dosis del injerto infundido y especificarse en todos los casos la constitución del injerto con el resto de los marcajes como por ejemplo CD3, CD45, conteo total de monocitos y NK que permita conocer

con mayor aproximación las características del injerto que se infundirá luego al paciente para evaluaciones más completas de su influencia o no en la evolución del trasplante.

10. En vista de la alta mortalidad por recaída y sepsis sugerimos intensificar la prevención, control y seguimiento de estas complicaciones inherentes al trasplante con especial precaución durante el primer año post-trasplante.

11. Realizar estudios a gran escala con colaboración internacional entre distintas Instituciones que permita el análisis de poblaciones con diversidad étnica bajo regímenes de acondicionamiento uniformes, determinaciones específicas del contenido del injerto y poblaciones de pacientes sometidos a los mismos tipos de trasplantes que permitan comprender cada vez más la función alorreactiva de NK sobre el trasplante y aclarar el camino para su uso como terapia celular en el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas.

## REFERENCIAS

1. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Inmunología de Kuby*. 6ta ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2007.
2. E. Donnall Thomas, Rainer Storb, Reginald A. Clift, Alexander Fefer, Leonard Johnson, Paul E. Neiman et al. Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med*. 1975; 292(17):895-902.
3. Chao N, Blume K. Bone marrow transplantation. Part I-Allogeneic. *West J Med*. 1989; 151:638-643.
4. National Cancer Institute. Programa Nacional de Donantes de Medula Ósea. Minneapolis, USA: última revisión el 02/05/2010. Hoja informativa: El trasplante de médula ósea y el trasplante de células madre de sangre periférica. Disponible en: <http://www.cancer.gov/publications> .
5. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Imm*. 2008; 20:581–587.
6. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. 6ta ed. Barcelona, España: Elsevier; 2008.
7. Instituto de Inmunología. Registro de la ONTV de pacientes trasplantados de células madres en Venezuela, periodo 1987- Diciembre 2010. Caracas: Instituto de Inmunología, Sección de Inmunogenética; 2011.
8. Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, William T. Shearer, Harry W, Schroeder Jr, Anthony J. Frew et al. *Clinical Immunology principles and practice*. 3era ed. Philadelphia, USA, Elsevier; 2008.
9. Moretta A, Pende D, Locatelli F, Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol*. 2009; 157(3):325-331.
10. Lorenzo Moretta, Franco Locatelli, Daniela Pende, Emanuela Marcenaro, Maria Cristina Mingari, Alessandro Moretta. Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011; 117(3): 764-771.
11. Benjamin J, Gill S, Negrin R. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2010; 22(2): 130–137.
12. Purdy A, Campbell K. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther*. 2009; 8(23): 13–22.
13. Symons H, Sue Leffell, Rossiter N, Zahurak M, Jones R, Fuchs E. Improved Survival with Inhibitory Killer Immunoglobulin Receptor (KIR) Gene Mismatches and KIR Haplotype B Donors

after Nonmyeloablative, HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2010; 16: 533-542.

14. Bashirova A, Martin M, McVicar D, Carrington M. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2006; 7:277-300.
15. Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology.* 2009; 129, 8–19.
16. Campbell K, Purdy A. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology.* 2010; 132, 315–325
17. Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, Layrisse Z, Parham P. High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes. *Immunogenetics.* 2006; 58:474-80.
18. Conesa A, Toro F, Tassinari P, Blanca I, Layrisse Z, Fernández-Mestre M et al. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the mestizo population from Venezuela. *Tissue Antigens.* 2010; 75(6):724-9.
19. Yawata M, Yawata N, Abi-Rached L, Parham P. Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor(KIR) gene family. *Crit Rev Immunol.* 2002; 22: 463–82.
20. Rajagopalan S, Long E.O. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *JEM.* 2005; 201 (7): 1025-1029.
21. Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia.* 2004; 18:2002–7.
22. L. Karabon, A. Jedynek, S. Giebel, D. Wołowiec, M. Kielbinski, D. Woszczyk et al. KIR/HLA gene combinations influence susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia and the clinical course of disease. *Tissue Antigens.* 2011; 78, 129–138.
23. Shahsavari F, Tajik N, Entezami KZ, Fallah Radjabzadeh M, Asadifar B, Alimoghaddam K et al. KIR2DS3 is associated with protection against acute myeloid leukemia. *Iran J immunol.* 2010; 7 (1):8-17.
24. Moretta A, Pende D, Locatelli F and Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol.* 2009; 157: 325-331.
25. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood.* 2007; 110:433-440.

26. Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, McQueen KL, Parham P. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL\*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at position 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol.* 2003; 171:6640-6647.
27. Thomas R, Yamada E, Alter G, Bashirova A, Norman PJ, Altfeld M et al. Novel KIR3DL1 alleles and their expression levels on NK cells: convergent evolution of KIR3DL1 phenotype variation? *J Immunol.* 2008; 180:6743-6750.
28. Baron F, Petersdorf EW, Gooley T, Sandmaier BM, Malkki M, Chauncey TR et al. What is the role for donor NK cells after nonmyeloablative conditioning? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(5): 580–588.
29. Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev.* 2006; 214:202-218.
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; 116(14):2411-9.
31. Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, Becknell B, McCoy JP Jr, Takahashi Y et al. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood.* 2004; 104:170-177.
32. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 1999; 94:333-339.
33. Stern M, Ruggeri L, Mancusi A, Bernardo ME, De Angelis C, Bucher C et al. Survival after T-cell depleted Haploidentical stem cell transplantation is improved with mothers as donors. *Blood.* 2008.
34. R. Willemze, C. Arrais Rodrigues, M. Labopin, I. Ionescu, K. Boudjedir, G. Sanz et al. Van Bekkum Award, Annual EBMT Meeting. Florence, Italy, 30 March–2 April 2008. Disponible en: <http://www.nature.com/bmt/journal/v41/n1s/pdf/bmt200830a.pdf>.
35. 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; 34:1673-1679.
36. Cooley S, McCullar V, Wangen R, Bergemann TL, Spellman S, Weisdorf DJ, et al. KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood.* 2005; 106:4370-4376.
37. Davies SM, Ruggeri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Blood.* 2002; 100:3825-3827.

38. Dawson MA, Spencer A. Successful use of haploidentical stem cell transplantation with KIR mismatch as initial therapy for poor-risk myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* .2005; 23:4473-4474.
39. Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H, et al. Japan Marrow Donor Program: Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype–patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical factors in outcome of HLA-C–KIR ligand mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2008; 14:75-87.
40. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2003; 102:814-819.
41. Joseph Sambrook and David W. Russel. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
42. DYNAL Biotech. KIR Genotyping SSP Kit Instructions for use. Disponible en [www.dynalbiotech.com](http://www.dynalbiotech.com).
43. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D y Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acid Research*. 2011; 39,913-919. Liverpool, U.K. Disponible en: <http://www.allelefrequencies.net/>
44. Norman and Streiner. *Biostatistics. The Bare essentials*. 3º ed. Ontario, Canadá: Bc Decker Inc ; 2008.
45. Instituto Nacional del Cáncer. Leucemia mieloide aguda en adultos: Tratamiento (PDQ®) Información general sobre la leucemia mieloide aguda en adultos. Minneapolis, USA: última revisión el 16/09/2011. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/leucemia-mieloideadultos/HealthProfessional>
46. Instituto Nacional del Cáncer. Leucemia mielógena crónica: Tratamiento (PDQ®) Información general sobre la leucemia mielógena crónica. Minneapolis, USA: última revisión el 04/11/2011. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/leucemiamielogena/HealthProfessional>.
47. Instituto Nacional del Cáncer. Leucemia linfoblástica aguda en adultos: Tratamiento (PDQ®) Información general sobre la leucemia linfoblástica aguda en adultos. Minneapolis, USA: última revisión el 16/09/2011. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/leucemia-linfoblastica adultos/HealthProfessional>.
48. Instituto Nacional del Cáncer. Síndromes mielodisplásicos: Tratamiento (PDQ®) Información general sobre los síndromes mielodisplásicos. Minneapolis, USA: última revisión el 20/04/2011. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/sindromemielodisplastico/HealthProfessional>.

49. Instituto Nacional del Cáncer. Linfoma no Hodgkin en adultos: Tratamiento (PDQ®). Información general sobre el linfoma no Hodgkin en adultos. Minneapolis, USA: última revisión el 12 de agosto de 2011. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/no-hodgkin-adultos/HealthProfessional>
50. YC Linn, CY Phang, TJ Lim, SF Chong, KK Heng, JJ Lee et al. Effect of missing killer-immunoglobulin-like receptor ligand in recipients undergoing HLA full matched, non-T-depleted sibling donor transplantation: a single institution experience of 151 Asian patients. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45(6):1031-7.
51. St. Jude Children's Research Hospital. Cure4Kids. Educación. Seminarios sobre Leucemias/Linfomas. Graft-Versus-Host Disease after Transplant in Pediatric Patients. Mariko DeWire, Presented: Julio 29, 2008. Disponible en: <http://www.cure4kids.org/ums/home/portal/>.
52. Clausen J, Kircher B, Auberger J, Schumacher P, Ulmer H, Hetzenauer G et al. The role of missing killer cell immunoglobulin-like receptor ligands in T cell replete peripheral blood stem cell transplantation from HLA-identical siblings. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16(2):273-80.
53. St. Jude Children's Research Hospital. Cure4Kids. Educación. Seminario especial sobre Complicaciones infecciosas en cáncer pediátrico: Mucositis. Joanna Acebo Ancentales. Presented: Febrero 08, 2011. Disponible en: [http://www.cure4kids.org/ums/home/seminars/seminars\\_list/seminar\\_detail/?ppts\\_id=2281](http://www.cure4kids.org/ums/home/seminars/seminars_list/seminar_detail/?ppts_id=2281).
54. St. Jude Children's Research Hospital. Cure4Kids. Educación. Seminario sobre Leucemias/Linfomas. Graft Vs. Host Disease. Aaron Weiss. Presented: Octubre 28, 2003. Disponible en: [http://www.cure4kids.org/ums/home/seminars/seminars\\_list/seminar\\_detail/?ppts\\_id=199](http://www.cure4kids.org/ums/home/seminars/seminars_list/seminar_detail/?ppts_id=199)
55. Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Control.* 2011; 18(4):268-76.
56. St. Jude Children's Research Hospital. Cure4Kids. Educación. Seminario especial sobre Choque Séptico en el Paciente Oncológico. Mario A. Melgar Toledo. Presented: Febrero 08, 2011. Disponible en: [http://www.cure4kids.org/ums/home/seminars/seminars\\_list/seminar\\_detail/?ppts\\_id=2304](http://www.cure4kids.org/ums/home/seminars/seminars_list/seminar_detail/?ppts_id=2304).
57. Torres-García D, Barquera R y Zuñiga J. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2008; 21(1). 57-65.
58. Nowakowski GS, Morice WG, Phyliky RL, Li CY y Tefferi A. Human leucocyte antigen class I and killer immunoglobulin-like receptor expression patterns in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. *Br J Haematol.* 2005; 128(4):490-2.

59. Izabela Nowak, Edyta Majorczyk, Andrzej Wis´niewski, Andrzej Pawlik, Maria Magott-Procelewska, Ewa Passowicz-Muszyn´ ska, et al. Does the KIR2DS5 Gene Protect from Some Human Diseases?. Plos One. 2010; 5(8) 1-6.
60. Scquizzato E, Teramo A, Miorin M, Facco M, Piazza F, Noventa F et al. Genotypic evaluation of killer immunoglobulin-like receptors in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. Leukemia. 2007; 21(5):1060-9.

# **ANEXOS**

## ANEXO N°1

### Concentraciones y radios de las muestras de ADN de Receptores

Receptores	Concentracion ADN	Ratio ADN
R1	10,7µg/ml/ 112,8	1,87
R2	8,5/151,9	2,12
R3	40	1,669
R4	45,7	1,67
R5	19,8	1,607
R6	30,3	1,618
R7	26,8	1,6
R8	57,1	1,652
R9	58,2	1,643
R10	36,9/167,8	1,665
R11	P4: 76,9 / P0: 105,6	1,605
R12	32	1,685
R13	65,8	1,701
R14	117,9	1,677
R15	82,3	1,661
R16	47,7	1,684
R17	71,1	1,688
R18	32,6	1,758
R19	30,4	1,762
R20	112,8 / 60,7	1,664 / 1,93
R21	108,9	1,694
R22	108	1,675
R23	85,9	1,683
R24	50,1	1,76
R25	10.1/ 99,2	3,2
R26	39,1	1,833
R27	26,1	1,821
R28	9,8 /90,93	1,775
R29	53,9	1,77
R30	258,9	1,714
R31	180,2	1,71
R32	29,2/91,35	1,85/1,750
R33	87,8	1,75
R34	12,5/48,1	1,714
R35	402,3	1,747
R36	81,2/77,1	1,639
R37	174,9	1,704
R38	56,2	1,031
R39	136,9	1,723
R40	143,9	1,711

**Nota:** Todas las Absorbancias se encontraron entre 260 y 280.

## ANEXO N°2

**Tabla de Concentraciones y radios de las muestras de ADN de Donantes**

Donantes	Concentracion ADN	Ratio ADN
D1	27,1 / 52,7	1,82
D2	54,1	1,762
D3	46,2	1,713
D4	42	1,631
D5	45,8	1,636
D6	30,2	1,619
D7	46,3	1,659
D8	54,7	1,605
D9	61,9	1,654
D10	21/ 169,3	1,692
D11	29,4 / 120,8	1,664
D12	62,2	1,689
D13	88,5	1,696
D14	59	1,67
D15	121,7	1,68
D16	88,9	1,717
D17	76	1,709
D18	100,8	1,695
D19	78	1,681
D20	68,6 /46,8	1,675 / 1,84
D21	145,3	1,675
D22	66,6	1,697
D23	111,4	1,697
D24	86,1	1,716
D25	32,1	1,906
D26	58,5	1,845
D27	28,9	1,847
D28	63,7	1,73
D29	59	1,78
D30	21,2/121,1	1,81
D31	75,6	1,73
D32	121,28	1,793
D33	84,8	1,78
D34	12,5/64,8	1,582/1,77
D35	399,9	1,739
D36	95,6	1,75
D37	264,5	1,698
D38	97,5	1,769
D39	28,3	1,897
D40	189	1,715

**Nota:** Todas las Absorbancias se encontraron entre 260 y 280.

ANEXO N°3

Codigo del Paciente:

Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Medicina  
Instituto de Inmunologia

Comorbilidades (cardio, neuro, neumo, endocrino, gastro, reuma, IDP, alergia, infecto):

**FICHA DE RECOLECCION DE DATOS  
(RECEPTOR)**

*Evaluación del Impacto de KIR y HLA clase I en la Evolución del Trasplante de Medula Ósea Haploidentico en Pacientes con Malignidades Hematológicas*

**IDENTIFICACION DEL RECEPTOR**

Nombres: \_\_\_\_\_  
Apellidos: \_\_\_\_\_  
Edad: \_\_\_\_\_ años  
C.I: \_\_\_\_\_  
Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_  
Sexo: Masculino: \_\_\_\_ Femenino: \_\_\_\_  
Estado Civil: \_\_\_\_\_  
Direccion actual: \_\_\_\_\_  
Ciudad: \_\_\_\_\_  
Estado: \_\_\_\_\_  
TLF: \_\_\_\_\_  
Nivel de Instrucción: \_\_\_\_\_  
Ocupacion: \_\_\_\_\_  
Raza: Mestizo: \_\_\_\_ Caucasico Americano: \_\_\_\_  
Caucasico: \_\_\_\_ Negro: \_\_\_\_ Asiatico: \_\_\_\_

**ESTUDIOS PRE y POST T.M.O**

Grupo Sanguineo: \_\_\_\_\_ Factor RH: \_\_\_\_\_

HLA clase I:

HLA A: \_\_\_\_\_  
HLA B: \_\_\_\_\_  
HLA C: \_\_\_\_\_

Serologia PreTMO (+/-): CMV IgM: \_\_\_\_\_  
IgG: \_\_\_\_\_ VEB IgM: \_\_\_\_\_ VEB IgG: \_\_\_\_\_

Serologia PostTMO (+/-): CMV IgM: \_\_\_\_\_  
IgG: \_\_\_\_\_ VEB IgM: \_\_\_\_\_ VEB IgG: \_\_\_\_\_

Quimerismo post TMO:

Tiempo postTMO: \_\_\_\_\_  
Porcentaje: \_\_\_\_\_

Estudio de KIR Inhibidores: \_\_\_\_\_

Estudio de KIR Activadores: \_\_\_\_\_

ANEXO N°3 (Continuación)

**DATOS SOBRE EL TRANSPLANTE DE MEDULA  
OSEA (TMO)**

Edad al momento del Transplante:  
\_\_\_\_\_ años

# de Transplantes Previos: \_\_\_\_\_

Diagnostico: \_\_\_\_\_

Estadio(al momento del TMO):  
\_\_\_\_\_

Fecha del TMO: \_\_\_\_\_

Tratamiento regular para la  
Enfermedad: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Esquema de Preparacion  
PreTransplante: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Inmunosupresion Post  
Transplante: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Diagnostico de Reaccion de Injerto Contra  
Huesped:** Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_

Fecha post TMO del  
diagnostico: \_\_\_\_\_

Aguda: \_\_\_\_\_ Cronica: \_\_\_\_\_

Organos  
afectados: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Dx de Rechazo :** Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_ Fecha post  
TMO: \_\_\_\_\_ Aguda: \_\_\_\_\_ Cronica:  
\_\_\_\_\_

Complicaciones Infecciosas post  
TMO: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

CMV: \_\_\_\_\_ VEB: \_\_\_\_\_

Micoticas: \_\_\_\_\_

Bacterianas: \_\_\_\_\_

**Diagnostico de Recaida** Si: \_\_\_\_\_

No: \_\_\_\_\_

# de Recaidas: \_\_\_\_\_

Fecha post TMO de la  
Recaida: \_\_\_\_\_ Aguda: \_\_\_\_\_

Cronica: \_\_\_\_\_

**Tiempo de Supervivencia libre de  
eventos:** \_\_\_\_\_

**Diagnostico de Remision:** Si: \_\_\_\_\_

No: \_\_\_\_\_

ANEXO N°4

Codigo del Receptor: \_\_\_\_\_

Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Medicina  
Instituto de Inmunologia

Raza: \_\_\_\_\_ Mestizo: \_\_\_\_\_ Caucasico  
Americano: \_\_\_\_\_ Caucasico: \_\_\_\_\_  
Negro: \_\_\_\_\_ Asiatico: \_\_\_\_\_

Enfermedades \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ base: \_\_\_\_\_

**FICHA DE RECOLECCION DE DATOS  
(Donante)**

*Evaluación del Impacto de KIR y HLA  
clase I en la Evolución del Transplante  
de Medula Ósea Haploidentico en  
Pacientes con Malignidades  
Hematológicas*

**IDENTIFICACION DEL DONANTE**

Nombres: \_\_\_\_\_

Apellidos: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ años

C.I: \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Lugar \_\_\_\_\_ de

Nacimiento: \_\_\_\_\_

Sexo: Masculino: \_\_\_\_\_ Femenino: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_

Direccion

actual: \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_

Estado: \_\_\_\_\_

TLF: \_\_\_\_\_

Nivel de Instrucción: \_\_\_\_\_

Ocupacion: \_\_\_\_\_

Relacion Consanguinea: Madre: \_\_\_\_\_  
Padre: \_\_\_\_\_ Hermano Gemelo: \_\_\_\_\_  
Hermano: \_\_\_\_\_

Tio (a) Materno: \_\_\_\_\_ Tio (a)  
Paterno: \_\_\_\_\_ Hijo (a): \_\_\_\_\_ Otros (Primo  
P, Primo M, Abuelos P, Abuelo  
M): \_\_\_\_\_

**ESTUDIOS PRE y POST T.M.O**

Grupo Sanguineo: \_\_\_\_\_ Factor RH \_\_\_\_\_

HLA clase I: HLA A: \_\_\_\_\_

HLA B: \_\_\_\_\_

HLA C: \_\_\_\_\_

Serologia PreTMO: CMV IgM: \_\_\_\_\_

IgG: \_\_\_\_\_ VEB IgM: \_\_\_\_\_ VEB

IgG: \_\_\_\_\_

Estudio \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ KIR

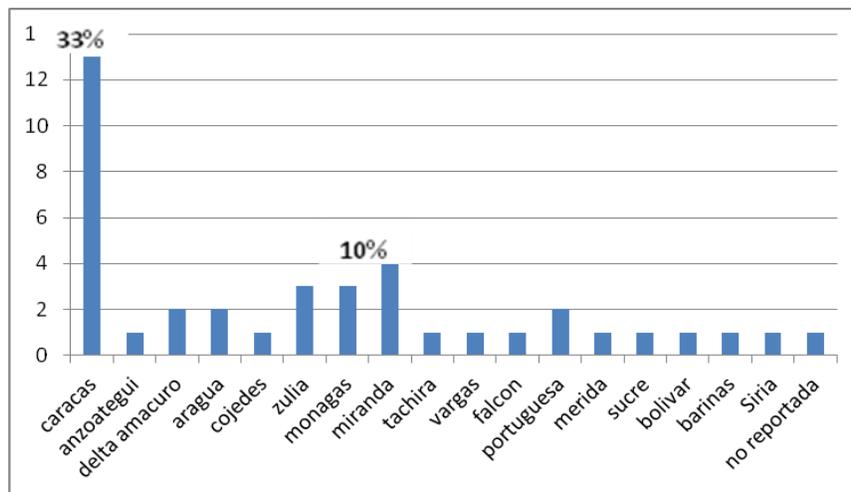
Inhibidores: \_\_\_\_\_

Estudio \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ KIR

Activadores: \_\_\_\_\_

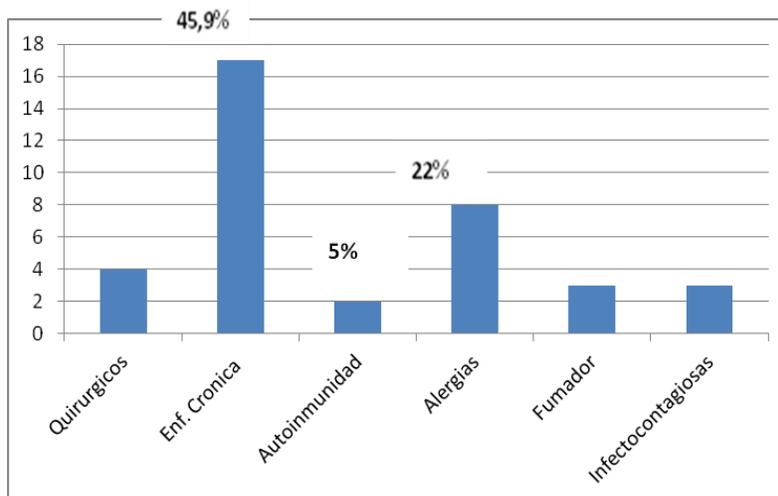
## ANEXO N°5

### Lugar de nacimiento de los pacientes del estudio. (n=40)



## ANEXO N°6

### Antecedentes patologicos de los pacientes. (n=40)



## ANEXO N°7

### Compatibilidad de HLA-A entre Receptores y Donantes correspondientes

<b>Receptores</b>	<b>HLA A</b>	<b>Donantes</b>
<b>R1</b>	A*11, A*32	<b>D1</b>
<b>R2</b>	A2, A29	<b>D2</b>
<b>R3</b>	A2, A3	<b>D3</b>
<b>R4</b>	A24, A32	<b>D4</b>
<b>R5</b>	A68	<b>D5</b>
<b>R6</b>	A*02, A*02	<b>D6</b>
<b>R7</b>	A24, A1101	<b>D7</b>
<b>R8</b>	A*11, A*24	<b>D8</b>
<b>R9</b>	A1101, A26	<b>D9</b>
<b>R10</b>	A2, A34	<b>D10</b>
<b>R11</b>	A24, A30	<b>D11</b>
<b>R12</b>	A*01, A*02	<b>D12</b>
<b>R13</b>	A*24, A*31	<b>D13</b>
<b>R14</b>	A*24	<b>D14</b>
<b>R15</b>	A*02, A*03	<b>D15</b>
<b>R16</b>	A*03, A*24	<b>D16</b>
<b>R17</b>	A*01, A*33	<b>D17</b>
<b>R18</b>	A2	<b>D18</b>
<b>R19</b>	A2	<b>D19</b>
<b>R20</b>	A*01, A*02	<b>D20</b>
<b>R21</b>	A24	<b>D21</b>
<b>R22</b>	A2, A30	<b>D22</b>
<b>R23</b>	A*02, A*26	<b>D23</b>
<b>R24</b>	A2, A24	<b>D24</b>
<b>R25</b>	A24, A30	<b>D25</b>
<b>R26</b>	A2, A11	<b>D26</b>
<b>R27</b>	A1, A3	<b>D27</b>
<b>R28</b>	A*24, A*68	<b>D28</b>
<b>R29</b>	A1, A3	<b>D29</b>
<b>R30</b>	A2, A24	<b>D30</b>
<b>R31</b>	A24, A68	<b>D31</b>
<b>R32</b>	A3, A24	<b>D32</b>
<b>R33</b>	A*01, A*32	<b>D33</b>
<b>R34</b>	A24, A29	<b>D34</b>
<b>R35</b>	A3, A24	<b>D35</b>
<b>R36</b>	A2, A1101	<b>D36</b>
<b>R37</b>	A2	<b>D37</b>
<b>R38</b>	A2	<b>D38</b>
<b>R39</b>	A*02, A*74	<b>D39</b>
<b>R40</b>	A24	<b>D40</b>

## ANEXO N°8

### Compatibilidad de HLA-B entre Receptores y Donantes correspondientes

Receptores	HLA B	Donantes
R1	B*15, B*57, Bw4, Bw6	D1
R2	B44, B52, BW4	D2
R3	B44, B40, BW4, BW6	D3
R4	B*15, B*52, BW4, BW6	D4
R5	B44, B40, BW4, BW6	D5
R6	B*07, B*35, BW6	D6
R7	B51, B55, BW4, BW6	D7
R8	B*40, B*55, BW4, BW6	D8
R9	B38, B52, BW4	D9
R10	B8, B38, BW6	D10
R11	B35, B49, BW6	D11
R12	B*44, B*49, Bw4	D12
R13	B*13, B*35, Bw4, Bw6	D13
R14	B*07, B*40, Bw6	D14
R15	B*14, B*38, BW4, BW6	D15
R16 <sup>†</sup>		D16 <sup>†</sup>
R17	B*08, B*50, Bw6	D17
R18	B44, B40, Bw4, Bw6	D18
R19	B39, B40, Bw6	D19
R20	B*15, B*57, Bw4, Bw6	D20
R21	B35, B40, Bw6	D21
R22	B13, B44, Bw4	D22
R23	B*35, B*51, Bw4, Bw6	D23
R24	B35, B51, Bw4, Bw6	D24
R25	B35, B15, Bw6	D25
R26	B35, B45, BW6	D26
R27	B8, B14, Bw6	D27
R28	B*40, B*45, Bw6	D28
R29	B8, B15, Bw6	D29
R30	B27, B35, Bw4, Bw6	D30
R31	B35, Bw6	D31
R32	B49, B52, Bw4	D32
R33	B*07, B*08, Bw6	D33
R34	B45, B15, Bw6	D34
R35	B7, Bw6	D35
R36	B27, B35, Bw4, Bw6	D36
R37	B44, B58, Bw4	D37
R38	B51, B58, Bw4	D38
R39	B*07, B*4004, Bw6	D39
R40	B35, B52, Bw4, Bw6	D40

**Nota:** † No se realizó la prueba en la pareja n° 16.

## ANEXO N°9

### Compatibilidad de HLA-C entre Receptores y Donantes correspondientes

Receptores	HLA C	Donantes
<b>R1</b>	Cw01, Cw07	<b>D1</b>
<b>R2</b>	Cw02, Cw16	<b>D2</b>
<b>R3</b>	Cw03, Cw05	<b>D3</b>
<b>R4</b>	Cw03, Cw12	<b>D4</b>
<b>R5</b>	Cw07, Cw03	<b>D5</b>
<b>R6</b>	CW*04, CW*07	<b>D6</b>
<b>R7</b>	Cw03 , Cw15	<b>D7</b>
<b>R8</b>	Cw03/Cw03	<b>D8</b>
<b>R9</b>	Cw12	<b>D9</b>
<b>R10</b>	Cw07	<b>D10</b>
<b>R11</b>	Cw02, Cw04	<b>D11</b>
<b>R12</b>	Cw05, Cw07	<b>D12</b>
<b>R13</b>	Cw01, Cw06	<b>D13</b>
<b>R14</b>	Cw03, Cw07	<b>D14</b>
<b>R15</b>	Cw08, Cw012	<b>D15</b>
<b>R16</b>	Cw02, Cw05	<b>D16</b>
<b>R17</b>	Cw06,Cw07	<b>D17</b>
<b>R18</b>	Cw03,Cw05	<b>D18</b>
<b>R19</b>	Cw03,Cw12	<b>D19</b>
<b>R20</b>	Cw03, Cw07	<b>D20</b>
<b>R21</b>	Cw01, Cw03	<b>D21</b>
<b>R22</b>	Cw03, Cw06	<b>D22</b>
<b>R23</b>	Cw04, Cw16	<b>D23</b>
<b>R24</b>	Cw01, Cw16	<b>D24</b>
<b>R25</b>	Cw01, Cw04	<b>D25</b>
<b>R26</b>	Cw04, Cw06	<b>D26</b>
<b>R27</b>	Cw07, Cw08	<b>D27</b>
<b>R28</b>	Cw03,Cw16	<b>D28</b>
<b>R29</b>	Cw03,Cw07	<b>D29</b>
<b>R30</b>	Cw01	<b>D30</b>
<b>R31</b>	Cw01,Cw04	<b>D31</b>
<b>R32</b>	Cw15,Cw12	<b>D32</b>
<b>R33</b>	Cw*07, Cw*17	<b>D33</b>
<b>R34</b>	cw02,Cw16	<b>D34</b>
<b>R35</b>	Cw1, Cw7	<b>D35</b>
<b>R36</b>	Cw01	<b>D36</b>
<b>R37</b>	Cw05,Cw07	<b>D37</b>
<b>R38</b>	Cw15,Cw06	<b>D38</b>
<b>R39</b>	Cw03,Cw07	<b>D39</b>
<b>R40</b>	Cw01,Cw15	<b>D40</b>

## ANEXO N°10

### Parejas con Incompatibilidad ABO (n=7)

Incompatibilidad ABO	N°	%
Donante A- receptor O	4	57,1%
Donante O- receptor B	1	14,3%
Donante A- receptor B	1	14,3%
Donante B- receptor A	1	14,3%
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>100%</b>

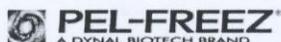
## ANEXO N°11

### Compatibilidades del factor RH+ y RH- entre parejas de donantes y receptores (n=40)

Factor	N° de parejas compatibles	%
RH+	36	90%
RH-	3	7,5%
No reportado	1	2,5%
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>7,5%</b>

## ANEXO N° 12

### Hoja de Trabajo del estuche KIR Genotyping SSP Kit



#### KIR Genotyping SSP Kit - WORKSHEET Code no.: 78930-3

Dynal Biotech  
Telephone: 800.558.4511  
Fax: 414.357.4518  
www.dynalbiotech.com

Institution _____	Purpose of Test _____	Taq Lot# _____
Sample I.D. _____	DNA Extraction Method _____	Lot# <u>003</u> Batch# _____
Name _____	DNA Conc. (ng/μl) _____	Expiration Date _____
Ethnic Origin _____	Tested by _____	Test Date _____
Donor/Patient _____	Reviewed by _____	Review Date _____

Typing Result (Check genes present)

2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4*001/ 002	2DS4*003- 006	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DS1	2DP1	3DP1*001/ 002/004	3DP1*003	
<input type="checkbox"/>																			

Typing Result +/-	Allele Specificity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	2DL1*001/002/00301-00303/0040101/0040102/005/006	1																				
	2DL2*001-005		2																			
	2DL3*001-006			3																		
	2DL4*00101/00102/0010301/0010302/00104/00201/00202/003-005/00601/007/0080101-0080103/0080201/0080202/009-011				4																	
	2DL5A*001/005					5	6															
	2DL5B*002/004					5		7	8													
	2DL5B*003					5			8													
	2DS1*001-004									9												
	2DS2*00101/00102/00103/002-005										10											
	2DS3*00101-00103											11										
	2DS4*0010101/0010102/0010103/00102/002												12									
	2DS4*003/004/006													13								
	2DS5*001-005														14							
	3DL1*00101/00102/002/00401/00402/005-009/01501/01502/016-019															15						
	3DL2*001-008/00901/010-013																16					
	3DL3*001/00201/00202/003/00401																	17				
	3DS1*010-014																		18			
	2DP1*00101/00102																			19		
	3DP1*001/002/004 (975bp)																				20	21
	3DP1*00301/00302 (344bp)																					20
	Product Size (bp)	145	145	510	230	257	1753	1893	1772	100	207	162	215	200	160	129	150	203	170	171	344/975	975
	Lane Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	Failed Controls																					
	False Positive																					
	False Negative																					

### ANEXO N°13

#### Presencia de recaídas asociadas a diferentes variables del estudio (n=35)

<b>Recaída vs Variable</b>	<b>Coefficiente de contingencia</b>	<b>Significativo</b>
<b>Antecedente de enfermedades crónicas</b>	0,098	No
<b>Antecedente de enfermedades inmunológicas</b>	0,148	No
<b>Diagnostico de Malignidades hematológicas</b>	0,192	No
<b>Recaídas previas al TMO</b>	0,100	No
<b>Tipo de trasplante</b>	0,215	No
<b>Infecciones en post-trasplante</b>	0,146	No
<b>Combinación de haplotipos y genotipos</b>	0,157	No
<b>Enfermedad de Injerto contra huésped</b>	0,071	No

### ANEXO N°14

#### Fallecimientos asociadas a diferentes variables del estudio (n=35)

<b>Fallecimientos vs Variable</b>	<b>Coefficiente de contingencia</b>	<b>Significativo</b>
<b>Diagnóstico de Malignidades hematológicas</b>	0,315	No
<b>Recaídas previas al TMO</b>	0,074	No
<b>Tipo de trasplante</b>	0,196	No
<b>Infecciones en post-trasplante</b>	0,143	No
<b>Combinación de haplotipos genotipos</b>	0,211	No
<b>Enfermedad de Injerto contra huésped</b>	0,024	No