



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

*Estudio de la posible asociación del sistema
KIR-HLA-I con la susceptibilidad a Hepatitis
Autoinmune tipo 1.*

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller María de los Angeles Bochichio como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(a)(es): Msc. Angela Conesa.
Msc. Herlinda Ramos

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE- 2009

DEDICATORIA

A Dios todo Poderoso que me escucha y acompaña siempre

A mis Padres, Marisa Di Rienzo, la Madre, Profesora y Amiga abnegada y
Tonino Bochichio quien me enseñó que todo es posible y que luchó cada día de su vida
para que cumpliera todas mis metas y fuera feliz, Gracias a ambos por darme todo para
llegar aquí, los amo.

A mi Hermana, Melissa que con su carácter y la fortaleza me apoyó y aconsejó siempre,
siempre contarás conmigo te quiero mucho.

A mis tíos y abuelos por siempre estar pendientes de mí y apoyarme.

Mary

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central de Venezuela por ser la casa de estudio que me permitió mi preparación y al Instituto de Inmunología por ser el centro que me brindo su apoyo tanto financieros como tecnológicos para la realización de la tesis.

A la Msc. Angela Conesa por ser un Tutor con paciencia y con excelente pedagogía, que me guio en todo el camino de la tesis.

A la Dra María del Pilar Fortes, por proveerme las muestras de ADN usadas en la investigación y por el tiempo y dedicación que invirtió en esta investigación. Sin ella no hubiese sido posible la realización del proyecto!!Gracias!!

A mi mamá y mi papá por brindarme incondicionalmente todo su apoyo moral, económico y sus enseñanzas que hoy por hoy son la base de lo que soy y seré el resto de mi vida.

A mis compañeros y amigos de la facultad de Ciencias, Lucelia, Esmeralda, Andrea, Miguel, Ruben, Nigmat, Arturo, Jessica, Ana, Floritza, Juan, Daniela por estos años tan gratos de su compañía, éxito en la vida.

A mi novio José, mi hermana, Rafa y a mis amigos de toda la vida Carla, Juan ,Maye y Adri gracias por estar allí cuando los necesité y brindarme todo su apoyo y compañía.

... y a todos aquellos que me han apoyado de diferentes maneras, Gracias y que Dios los

Bendiga.

Resumen

ESTUDIO DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN DEL SISTEMA KIR-HLA-I CON LA SUSCEPTIBILIDAD A HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO I. (Study of the possible association of the system KIR-HLA- I with the susceptibility to autoimmune hepatitis type 1).

Bochichio M.¹; Conesa A.¹; Fortes M.¹

¹Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina, UCV. marybochichio660@gmail.com

Estudios recientes han demostrado que las células NK expresan familias de receptores, que generan tanto señales activadoras como inhibitoras de la actividad citotóxica de las mismas. Entre estos receptores se encuentran los KIR perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. El polimorfismo de KIR e interacción con combinaciones específicas KIR-HLA, están relacionadas con la susceptibilidad o resistencia a numerosas enfermedades. Por ello, el objetivo de este trabajo es el estudio de la posible asociación del sistema KIR-HLA con la susceptibilidad a Hepatitis Autoinmune tipo 1, ya que sobre dicha enfermedad no se ha realizado ningún estudio referente a estos receptores. El estudio se realizara mediante aislamiento de ADN de la capa de blancos (Buffy coat) y su posterior amplificación mediante PCR-SSP con cebadores sentido y antisentido específicos para cada KIR. El estudio de los alelos HLA se realizará mediante la hibridación con sondas específicas de Oligonucleótidos (PCR-SSO) usando el estuche comercial de Dynal Reli™ SSO HLA Typing Kit. Los resultados muestran que 2DL1, 2DL3 y 2DP1 así como las combinaciones 3DL1 HLA-Bw4 y 2DL3 HLA-C1 confieren protección a individuos con HAI tipo 1. En cambio 2DL2 con HLA-C1 ambos en condición homóciga, pudieran conferir susceptibilidad a HAI tipo 1, lo cual nos lleva a concluir que la presencia de las combinaciones encontradas podrían actuar inhibiendo la actividad citotóxica de las células NK y por ende, actuar como un factor protector.

Índice de contenido

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Resumen.....	III
Indice de Contenido.....	IV
Indice de Figuras.....	VI
Indice de Tablas.....	VIII
Indice de Anexos.....	IX
Indice de Abreviaturas.....	X
Introducción	1
1.-Receptores KIR	3
2.-KIR y sus ligandos.....	8
3.-Hepatitis Autoinmune.....	10
4.-Hepatitis Autoinmune y HLA.....	13
Antecedentes.....	15
1.- KIR y asociación a Enfermedades.....	15
Objetivos	22
Materiales y métodos	23
1.-Población estudiada.....	23
2.-Aislamiento de ADN genómico.....	24
3.-Tipificación de los genes KIR.....	26
4.-Tipificación de HLA	29
5.-Análisis estadístico.....	31
Resultados.....	33
1.- Distribución de genes KIR.....	33

2.-Tipificación de los alelos HLA	45
3.-sistema KIR- HLA clase I.....	47
Discusión	53
Conclusiones.....	62
Referencias bibliográficas.....	63
Anexos.....	68

Índice de figuras.

Figura 1.- Representación de la región del cromosoma humano 19q13.4.....	4
Figura 2.- Esquema representativo de la estructura y clasificación de los receptores KIR	4
Figura 3.- compilación de genotipos d KIR en 4 poblaciones estudiadas (caucásicos, este y oeste de asia, africanos).....	7
Figura 4.- Esquema representativo del brazo corto del cromosoma 6 de humano.....	9
Figura 5.- Esquema de la respuesta inmune desencadenada por un auto antígeno en las células hepáticas	12
Figura 6.- registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 2 % para el gen 2DL2.....	34
Figura 7.- registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 2 % para el gen 2DS2.....	35
Figura 8.- distribución de la frecuencia del total de los genes KIR inhibidores y activadores.....	36
Figura 9.- distribución de la frecuencia de individuos con menos de 2 genes KIR activadores e individuos con mas de 2 genes activadores.....	36
Figura 10.- porcentaje de pacientes por sexo	41
Figura 11.- Genotipos de KIR de la población mestiza venezolana afectada con HAI tipo 1 y su comparación con individuos sanos.....	44
Figura 12.- Genotipos de KIR de una población mestiza venezolana afectada con HAI tipo 1 y su comparación con individuos sanos.....	45
Figura 13.- Representación del sistema de tipificación de HLA- C.....	46

Figura 14.- Presencia o ausencia de la combinación de KIR2D con sus ligandos

HLA-C.....52

Índice de Tablas.

Tabla 1.- Afinidad de los receptores KIR por diversos ligandos HLA	9
Tabla 2.- Asociaciones de los receptores KIR y sus ligandos HLA con enfermedad.....	21
Tabla 3.- Secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación de los receptores KIR.....	27
Tabla 4.- Distribución de la frecuencia de los genes KIR.....	40
Tabla 5.- Frecuencia de los genes KIR en su forma homóciga 2DL2/2DL2, 2DL3/2DL3 y la combinación 2DL2/2DL3.....	41
Tabla 6.- Frecuencia de los ligandos HLA en su forma homóciga (HLA C1C1 o HLA C2C2 en individuos con HAI tipo 1 y sanos.....	47
Tabla 7.- Frecuencia de los genes KIR y la unión a sus ligandos HLA-A.....	48
Tabla 8.- Frecuencia de los genes KIR y la unión a sus ligandos HLA-B.....	48
Tabla 9.- Frecuencia de los genes KIR y la unión a sus ligandos HLA-C.....	49
Tabla 10.- Frecuencia de los ligandos HLA en su forma homóciga (HLA C1C1 o HLA C2C2) en combinación con los genes KIR.....	50
Tabla 11.- Frecuencia de los ligandos HLA C1C1 en combinación con los genes KIR en su condición homóciga.....	51

Índice de Anexos.

Anexo 1.Tabla 12.- Criterios para el diagnóstico de Hepatitis Autoinmune tipo 1.....	68
---	----

Anexo 2.- Consentimiento Informado.....	70
Anexo3. Tabla 13.- Distribución de la frecuencia de genes KIR por grupo de edades.....	70
Anexo 4. Tabla 14.- Tabla comparativa de la frecuencia de genes KIR en el grupo de individuos mayores de 18 años.....	71
Anexo 5. Tabla 15.- Distribución de la frecuencia de genes KIR en individuos sanos Sexo.....	por 72
Anexo 6. Tabla 16.- Distribución de la frecuencia de genes KIR por Sexo en población mestiza venezolana con padecimiento de Hepatitis Autoinmune tipo 1.....	73
Anexo 7. Tabla 17.- Distribución de la frecuencia de genes KIR en individuos del sexo masculino.....	74
Anexo 8. Tabla 18.- Distribución de la frecuencia de genes KIR en individuos del sexo masculino.....	75

Índice de Abreviaturas.

TCR : receptor para el antígeno de los linfocitos T.
BCR: receptor para el antígeno de las células B.
NK : natural Killer.
KIR: Killer Immunoglobulin-like Receptor.
LCR: Complejo receptor leucocítico.
Ig: Inmunoglobulinas.
2D o 3D: dominios semejantes a Ig.
2P o 3P: Pseudogenes putativos.
L: largo.
S: corto.
ITIM : motivos inhibidores basados en tirosina.
ITAM : motivos activadores basados en tirosina.
D0, D1, D2: dominios extracelulares.
DAP-12: molécula adaptadora.
MHC-I : Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I.
HLA : Antígenos Leucocitarios Humanos.
HAI: Hepatitis Autoinmune.
ANA: anticuerpos anti-nucleares.
SMA: anti-músculo liso.
LKM-1: anti-microsomales de hígado-riñón
CYP2D6 epítotope del citocromo P450
ALC-1: antígeno de hígado-citosol .
anticuerpos anti-SLA : antígeno soluble hepático.
TH0: linfocito T ayudador no diferenciado
TH1 o TH2: linfocito T ayudador diferenciado.
IL: interleuquinas o interleucinas.
IFN- γ : interferon gamma .
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humano
HCV: Hepatitis C
CMV: Cytomegalovirus.
LES: Lupus Eritematoso Sistémico
AL: buffer de lisis
AW1: Buffer de lavado.
AE: buffer de elución.
PCR-SSP: Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers.
Cf: concentración final.
Pb: pares de bases
TBE: Tris-Borato-EDTA
GH1: Hormona de crecimiento 1.
PCR-SSO: hibridación con sondas específicas de Oligonucleótidos
OR: Odds ratio
IC: intervalo de confianza
f: frecuencia génica

Introducción

Los seres vivos son susceptibles a la agresión por microorganismos patógenos, por lo que requieren un sistema de defensa, el cual se denomina sistema inmunitario (Corado y Mora de Orta, 2000). La acción eficaz del sistema inmunitario desencadena en el individuo la denominada Inmunidad; término que describe un estado de protección y resistencia frente a agentes patógenos o potencialmente dañinos que afecten al individuo. La defensa del organismo contra agentes patógenos está mediada por las reacciones precoces de la inmunidad innata y las reacciones tardías de la inmunidad adaptativa (Abbas y col., 2002).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa y se desencadena de manera inmediata ante cualquier señal de alarma detectada por el organismo (Corado y Mora de Orta, 2000). Está constituida por mecanismos existentes antes que se desarrolle la infección, los cuales son capaces de establecer respuestas rápidas contra los microorganismos (Abbas y col., 2002). Los componentes principales de la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas (epitelios y sustancias antimicrobianas), las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y las células citotóxicas naturales (NK según sus siglas en inglés de *natural killer*), mediadores de inflamación y citocinas. Es una respuesta inespecífica, independiente del número de contactos que se tengan con un mismo agente y no genera memoria inmunitaria (Corado y Mora de Orta, 2000). En contraste, existen mecanismos de defensa mucho más evolucionados que son estimulados tras la exposición de agentes infecciosos, y cuya intensidad y capacidad aumentan después de cada exposición subsiguiente a un determinado microorganismo, lo

cual recibe el nombre de inmunidad adaptativa. Las características de esta respuesta, radican en una especificidad extraordinaria para macromoléculas diferentes, su gran capacidad de memoria y de responder con mayor intensidad tras exposiciones repetidas al mismo microorganismo (Abbas y col., 2002).

Entre los componentes celulares que juegan un papel importante en la inmunidad innata, se encuentran las células NK, las cuales son una sub población de los linfocitos derivados de la médula ósea, que no expresan en su superficie el receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR) ni el receptor para el antígeno de las células B (BCR). Se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo, en la sangre, tracto gastrointestinal, hígado, bazo, pulmones, endometrio, placenta y los ganglios linfáticos. Estas células están programadas para reconocer y matar células blanco patógenas, así como producir diversas citocinas y quimiocinas (Bashirova y col., 2006). Las células NK expresan familias de receptores tanto activadores como inhibidores, cuyos ligandos corresponden a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I) llamado en el hombre HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos). Entre estos receptores podemos citar los receptores de muerte tipo inmunoglobulina KIR (de sus siglas en inglés Killer Immunoglobulin-like Receptor) pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, los cuales poseen funciones tanto inhibitoras como activadoras y reconocen una variedad de HLA-I clásicos, por otro lado, los receptores CD94/NKG2, pertenecientes a la familia de las lectinas, reconocen moléculas HLA-I no clásicas (HLA-E) y pueden ser tanto inhibidores como activadores; además encontramos los LILR, receptores leucocitarios tipo Inmunoglobulinas, con función inhibitora que poseen una amplia reactividad con todas las moléculas HLA-I (Bashirova y col., 2006).

Receptores KIR

La familia de los receptores KIR en humanos se encuentra codificados por 15 genes y 2 pseudogenes ubicados en una región de aproximadamente 150 Kb en el complejo receptor leucocitario (LRC) en el cromosoma humano 19q13.4 (Lewis, 2005) (figura 1). El grupo de genes *KIR* codifican proteínas que tienen diversos patrones de reconocimiento (alotipos específicos de HLA clase I) lo cual confiere diversas señales activadoras o inhibidoras. Así este grupo está compuesto por 8 genes inhibidores y 6 genes activadores. Estos receptores se clasifican estructuralmente según sus dominios extracelulares, como 2D o 3D (número de dominios semejantes a Ig), 2P o 3P, que denota pseudogenes putativos y L (de sus siglas en inglés Large) o S (de sus siglas en inglés Short), según sea su región citoplasmática (figura 2). Esta clasificación predice su función, receptores KIR con colas citoplasmáticas largas son inhibidores, ya que poseen uno o dos motivos inhibidores basados en tirosina (ITIM) que liberan una respuesta inhibitoria (con excepción de *2DL4*); mientras receptores con región citoplasmática corta, poseen un aminoácido en el dominio transmembrana, el cual permite la asociación con la molécula adaptadora DAP-12, disparando una señal activadora mediante un motivo activador basado en tirosina (ITAM). La similitud en la estructura y secuencia de las moléculas KIR definen 3 tipos de dominios extracelulares denominados D0, D1 y D2. Las moléculas que pertenezcan al grupo 3D poseerán los tres tipos de dominios en cambio los KIR2D pueden poseer D1-D2 (tipo I) o D0-D2 (tipo II) (Bashirova y col., 2006).

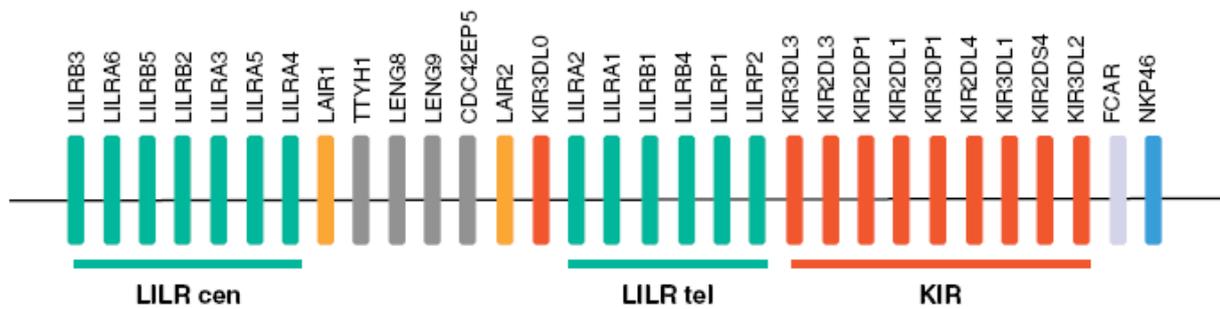


Fig. 1.- Representación de la región del cromosoma humano 19q13.4. Incluyen un grupo de los receptores de las células NK; entre los que encontramos: genes KIR (zonas rojas) en el complejo receptor leucocitario (de sus siglas en inglés LRC), los receptores leucocitarios semejantes a inmunoglobulinas (LILR) representados por el color turquesa, el receptor Fc alfa (FCAR) observado de color gris claro, los receptores leucocitarios asociados semejantes a inmunoglobulinas (LAIRs) representados en amarillo y los Nkp46 representados en azul (Tomado de Bashirova y col., 2006).

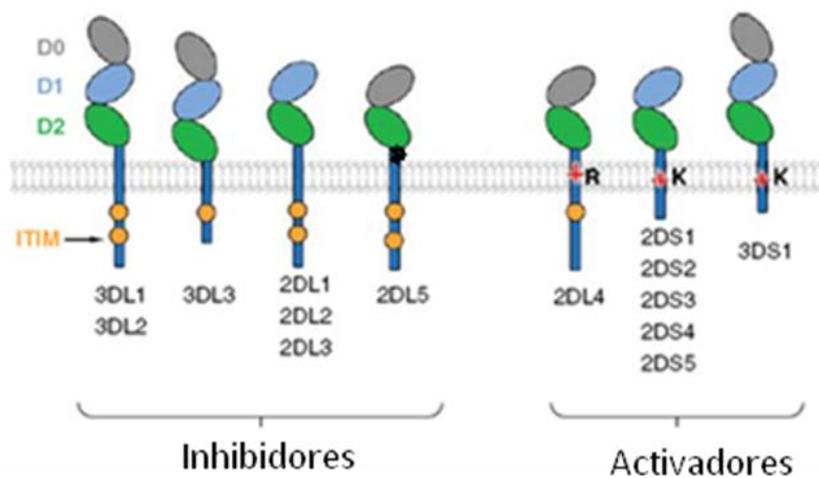


Fig. 2. Esquema representativo de la estructura y clasificación de los receptores KIR. Se muestra un grupo de genes con colas citoplasmáticas largas y motivos ITIM, que les confiere función inhibitoria y otro grupo, los cuales poseen cola citoplasmática corta y un aminoácido básico en su región transmembrana, que confiere una función activadora (Tomado de Bashirova y col., 2006).

La diversidad de los genes *KIR* está relacionada con la variabilidad en el número y tipo de genes (inhibidores o activadores) y la variación haplotípica y alélica, lo cual explica el polimorfismo de KIR en humanos (Rudnick y col., 2008). Uhrberg y colaboradores en 1997, definieron dos haplotipos básicos de los genes KIR basados en el contenido de sus genes. El más común es el haplotipo A, el cual contiene sólo dos genes KIR activadores (*2DS4* y *2DL4*), dos pseudogenes (*2DP1*, *3DP1*) y cinco genes KIR inhibidores (*2DL1*, *2DL3*, *3DL1*, *3DL2* y *3DL3*), por lo que

puede considerarse como un haplotipo homogéneo e inhibidor. Cabe destacar, que individuos con dos copias de este haplotipo (designado como *AA*) se encuentran con una frecuencia del 56 % en la población japonesa, alrededor del 30% en Caucásicos y 1.5% en aborígenes australianos (Khakoo y Carrington, 2006). Por el contrario, el haplotipo *B*, es considerado un grupo heterogéneo, ya que posee una gran variedad en el contenido de sus genes, especialmente con respecto a los genes activadores, ya que se encuentran cinco genes activadores como lo son *2DS2*, *3DS1*, *2DS5*, *2DS1*, *2DS3*. En cuanto a los genes KIR inhibidores que se ubican en el haplotipo *B*, encontramos *3DL3*, *2DL1*, *2DL2*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL2* y sus respectivos pseudogenes (*2DP1* y *3DP1*) (Bashirova y col., 2006).

La segregación familiar de haplotipos con diferente contenido de genes genera diversidad en el número y tipo de genes KIR heredados en cada individuo, produciendo una diversidad poblacional en el perfil de genes y genotipos (Du y col., 2007). Varios estudios poblacionales sobre genes KIR se han reportado. Yawata y colaboradores en el 2002 recopilaron la data de 989 individuos de 4 poblaciones (Caucásicos, africanos y asiáticos del este y del oeste), y basado principalmente en la presencia o ausencia de los 15 genes KIR, determinada por la amplificación en cadena de la polimerasa mediante secuencias iniciadoras específicas (PCR-SSP), (figura 3) estos autores reportaron un total de 111 genotipos de KIR diferentes. El genotipo más frecuente (27%) se encontró conformado por la presencia de, al menos 7 genes KIR, de los cuales uno sólo es activador (*2DS4*), pudiendo clasificarse este genotipo como inhibidor y homogéneo, todo lo cual concuerda con el haplotipo básico A señalado anteriormente (Yawata y col., 2002).

La distribución de los genes KIR se ha estudiado en diferentes poblaciones a nivel mundial. Específicamente en Centro y Suramérica se han reportado estudios en México, Argentina y Brasil. En Venezuela este estudio se ha realizado en tribus amerindias: Warao, Yucpa y Bari y en población mestiza venezolana (Conesa y col, papel en revisión).

KIR genes	KIR genes															Number of KIR genes	Caucasian n=404 %	W. Asian 363	E. Asian 160	African 62	Total 989	
	2DL					3DL					2DS											3DS
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5							1
1																	7	31.2	14.9	40.6	35.5	27.0
2																	9	14.9	9.1	10.0	8.1	11.5
3																	11	6.7	9.6	3.1	11.3	7.5
4																	11	7.2	4.4	8.1	6.5	6.3
5																	14	4.2	3.3	2.5		3.3
6																	13	4.5	2.5	3.1		3.2
7																	10	3.7	3.0		3.2	
8																	13	3.0	1.4	2.5		2.1
9																	10	1.5	3.3	1.3		2.0
10																	12	1.2	3.0	0.6	1.6	1.6
11																	12	1.7	1.7	3.1		1.8
12																	11	1.5	0.8	5.0		1.7
13																	12	0.5	3.3	1.3		1.6
14																	13	1.5	1.9	1.3		1.5
15																	11	0.5	1.9		1.6	1.0
16																	7	1.7	0.6	0.6		1.0
17																	11	1.9	1.3			0.9
18																	12	1.2	0.8	0.5		0.9
19																	12	0.7	0.8	1.3		0.8
20																	12	0.5	1.7			0.8
21																	8	0.2	1.4	1.3		0.8
22																	12	0.7	0.8		1.6	0.7
23																	10	0.5	0.6	1.9		0.7
24																	9	0.5	0.6	1.9		0.7
25																	10	1.5				0.6
26																	10	1.0	0.6			0.6
27																	13		1.4			0.5
28																	12	0.5	0.6	0.6		0.5
29																	12	0.2		2.5		0.5
30																	11	0.2	1.1			0.5
31																	7		1.4			0.5
32																	11		0.3	0.6	3.2	0.4
33																	10		0.8		1.6	0.4
34																	9				6.5	0.4
35																	10		1.1			0.4
36																	8	0.7			1.6	0.4
37																	10	0.2	0.6		1.6	0.4
38																	9	0.5	0.6			0.4
39																	10	0.2	0.6		1.6	0.4
40																	12	0.2	0.6			0.3
41																	13	0.2	0.6			0.3
42																	11	0.5	0.3			0.3
43																	9	0.2	0.6			0.3
44																	9					0.3
45																	9			1.9		0.3
46																	10		0.6	0.6		0.3
47																	8	0.7				0.3
48																	10		0.3		1.6	0.2
49																	12		0.8			0.2
50																	11		0.6			0.2

Fig 3. Compilación de genotipos de KIR en cuatro poblaciones estudiadas (caucásicos, este y oeste de Asia, africanos). Los cuadros de color negro representan la presencia de los genes y los cuadros blancos la ausencia de los mismos. Se muestran los 111 genotipos encontrados en orden de frecuencia en la población estudiada (n= 989) (tomado de Yawata y col., 2002).

KIR y sus ligandos.

Los receptores KIR poseen afinidad por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I) llamado en el hombre HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos), cuyos genes se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (figura 4) (Cassinotti y col., 2009). La nomenclatura designada por la organización Mundial de la Salud, en la región I, describe ocho locis identificados como HLA-A, B, C, E, J, F, G, H. Luego de la letra mayúscula, se escriben cuatro dígitos, de los cuales los dos primeros representan el gen y los dos últimos el alelo correspondiente (Corado y Mora de Orta 2000). Así, KIR2DL1 y su contraparte activadora KIR2DS1 reconoce un epítipo presente en los alelos de HLA-C del grupo 2 (HLA-C2), como lo son HLA-Cw2, Cw4, Cw5, Cw6, Cw17 y Cw18, los cuales se encuentran caracterizados por poseer Asparagina (Asn) en la posición 77 y lisina (Lys) en la posición 80 en la hélice α 1 de la molécula MHC. Por otra parte, KIR2DL2 su contraparte KIR2DS2 y KIR2DL3, reconocen a moléculas HLA-C del grupo 1 (HLA-C1) conformado por los alotipos Cw1, Cw3, Cw7, Cw8, Cw13 y Cw14, este grupo está caracterizado por poseer una Serina (Ser) en la posición 77 y Asn en la posición 80. KIR2DS4 posee afinidad por ligandos HLA-Cw4. Otros KIR como KIR3DL1 y KIR3DS1 reconocen alelos HLA-B que poseen un motivo Bw4 definido serológicamente y que posee isoleucina (Ile) en la posición 80, y KIR3DL2 reconoce HLA-A3/A11 los cuales son moléculas del MHC- I clásicas, en cambio, 2DL4 posee afinidad por una molécula de HLA-I no clásica (HLA-G), la cual se distribuye en el trofoblasto fetal durante el embarazo (Frag y col., 2006). Los otros receptores KIR no han sido identificados sus ligandos específicos (tabla 1).

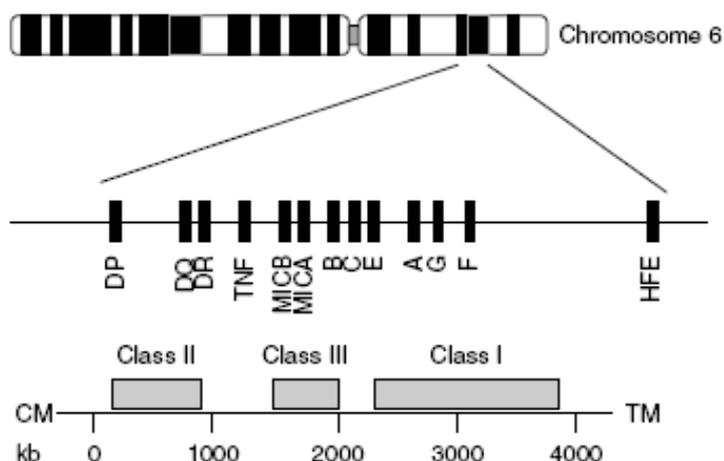


Fig. 4. Esquema representativo del brazo corto del cromosoma 6 de humanos. Se muestra la ubicación de los genes para las moléculas del MHC. Tres clases de genes han sido identificados (I, II, y III) en este cromosoma, estas difieren en su estructura y función. Las moléculas HLA- I clásicas son HLA-A, -B, y -C y las no clásicas son HLA-E, -F, -G. (Tomado de Cassinotti y col., 2009).

TABLA I. AFINIDAD DE LOS RECEPTORES KIR POR DIVERSOS LIGANDOS HLA.

KIR	Ligandos
2DL1, 2DS1	HLA-C2: Cw2,Cw4,Cw5,Cw6,Cw15, Cw17.
2DL2, 2DS2, 2DL3	HLA-C1:Cw1,Cw3,Cw 7,Cw 8,Cw12,Cw13, Cw 14.
2DL4	HLA G
2DS4	HLA Cw4
3DL1,3DS1	HLA Bw4. Posee Ise 80.
3DL2	HLA- A3, A11

HLA-C2: alelos HLA del grupo 2 (poseen Asn 77, Lys 80);
 HLA-C1: alelos HLA del grupo 1 (poseen Ser 77, Asn 80.);
 HLA-Bw4: motivo de HLA-B definido serológicamente (posee Ile 80).
 (Tomado y modificado de Bashirova y col., 2006).

Hepatitis Autoinmune

La hepatitis autoinmune (HAI) es una enfermedad de etiología desconocida, que afecta principalmente a mujeres y está caracterizada por una destrucción progresiva del parénquima hepático (Djilali y col., 2006). Es una enfermedad inflamatoria predominantemente periportal, asociada a hipergamaglobulinemia, frecuentemente con autoanticuerpos detectables y buena respuesta a tratamiento inmunosupresor (Soza, 2007). Los síntomas son variables, ya que la enfermedad tiene un curso fluctuante; el paciente puede presentar síntomas inespecíficos como fatiga, náuseas, dolor abdominal y dolores articulares. Algunos padecen hepatitis aguda ictericia similar a una hepatitis viral. En estos pacientes no es raro que la enfermedad ya esté en etapa de cirrosis. Kessler y col. (2004) demuestran que 8 de 10 pacientes examinados presentan hepatitis aguda fulminante, presentando ictericia y encefalopatía. La hepatitis autoinmune se clasifica en tipo 1; la forma más frecuente y puede observarse a cualquier edad, se caracteriza por la presencia de anticuerpos anti-nucleares (ANA) o anti-músculo liso (SMA) y tipo 2; presente en niños y adolescentes, su marcador más característico es la presencia en suero de anticuerpos anti-microsomales de hígado-riñón (LKM-1), que reflejan anticuerpos contra un epítipo del citocromo P450 (CYP2D6) o contra un antígeno de hígado-citosol (ALC-1). Algunos autores han propuesto hepatitis autoinmune tipo 3, caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-SLA (antígeno soluble hepático), pero la utilidad de esta clasificación está en discusión, ya que su evolución clínica es similar a la tipo 1 (Soza, 2007).

Los estudios inmunohistoquímicos han identificado el fenotipo de las células inflamatorias que se infiltran en el hígado cuando un individuo padece HAI. Los linfocitos T en conjunto con el receptor de célula T alfa/beta es predominante.

Entre las células T existentes, se distingue un grupo mayoritario, positivo para el fenotipo CD4 ayudador/inductor; y un grupo menor para el fenotipo CD8 citotóxico/supresor. Además se observa la presencia de células NK (CD16/CD56 positivo), macrófagos y Linfocitos B (Vergani y Mieli-Vergani, 2004). La constitución inmune del hígado es bastante distinta de otros órganos. En contraste con la sangre periférica, la población principal linfoide en el hígado normal es 30 % de células NKT, células de T convencionales (20 % TCR), células NK (20 %) y muy pocos linfocitos B (5 %). Las células T asesinas naturales son una población única de células que expresa tanto CD3 como NK1 sobre su superficie de célula, secreta IL-2, IL-4 y IFN- γ (Peters, 2002).

En esta enfermedad un ataque autoinmune a las células del hígado inicia una cascada de eventos que provoca una respuesta pro-inflamatoria (Goldberg y col., 2007). En la figura 5 se muestra como un autoantígeno específico, es presentado a un linfocito T ayudador no diferenciado (TH0) por la molécula de HLA clase II de una célula presentadora de antígeno. La células TH0 se activan, diferenciándose en TH1 o TH2, de acuerdo a la naturaleza del antígeno y a la presencia de interleucina 12 (IL-12) o IL-4 en el medio ambiente, e iniciando una serie de reacciones inmunes determinadas por las citocinas que ellos producen: TH2 secreta principalmente IL-4 e IL-10 e induce la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B. TH1 secreta IL-2 e interferón gamma (IFN- γ), estimulando los linfocitos T citotóxicos, aumentando la expresión de moléculas HLA-I e induciendo la expresión de moléculas HLA-II en hepatocitos y macrófagos activados, quienes liberan IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Si las células T reguladoras no actúan de forma efectiva, una variedad de mecanismos efectores pueden dispararse conduciendo a la destrucción de células del hígado que pueden

derivarse de la acción de linfocitos T citotóxicos; citocinas liberadas por TH1; reclutamiento de macrófagos y activación del complemento (Vergani y Mieli-Vergani, 2004).

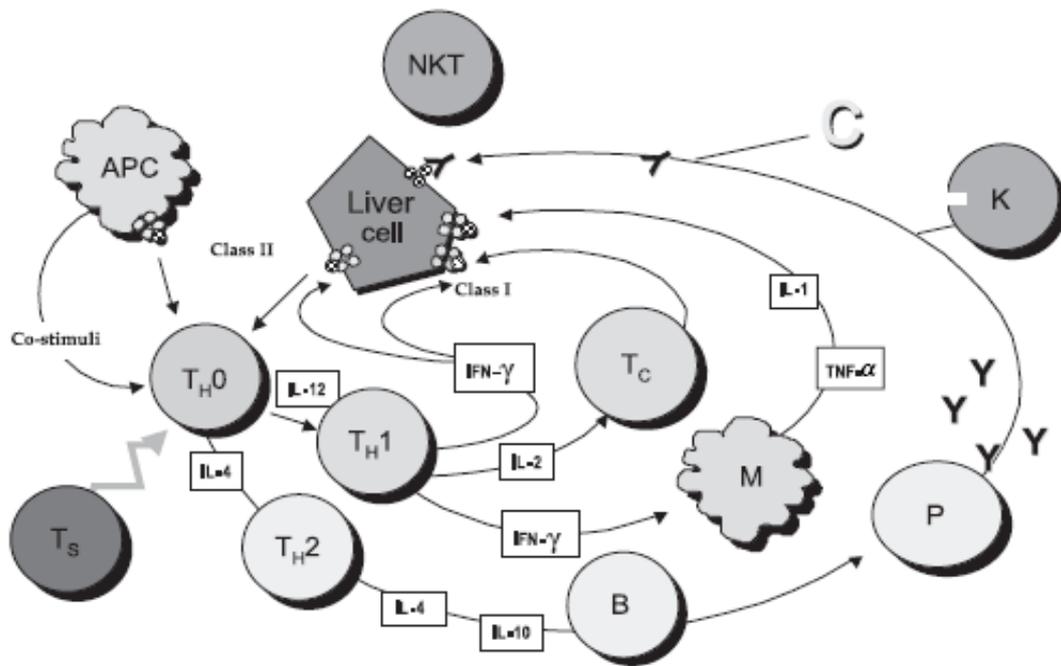


Fig. 5.- Esquema de la respuesta inmune desencadenada por un autoantígeno en las células hepáticas Un autoantígeno específico, es presentado a un linfocito T ayudador no diferenciado (TH0). La células TH0 se activan, diferenciándose en TH1 o TH2, así TH2 secreta principalmente IL-4 e IL-10 y la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B; en cambio TH1 secreta IL-2 e interferon gamma (IFN- γ), lo cual estimula los linfocitos T citotóxicos, aumentando la expresión de moléculas HLA-I e induce la expresión de moléculas HLA-II en hepatocitos y macrófagos activados, quienes liberan IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (tomado de Vergani y Mieli-Vergani, 2004).

Hepatitis Autoinmune y HLA.

Diferentes antígenos HLA están asociados a enfermedades de acuerdo al grupo étnico y la zona geográfica afectada, edad de presentación y perfil serológico (Duarte y col., 2009). Estudios realizados por Czaja y colaboradores (1997), demuestran que la predisposición genética a HAI se encuentra relacionada con genes clase II del MHC, más específicamente a antígenos leucocitarios humanos (de sus siglas en inglés HLA), que poseen el locus DR (revisado en Fortes y col., 2007). La región clase II se identifica con la letra D, esta región incluye numerosos loci, identificados en letras mayúsculas de la siguiente manera: HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DM, HLA-DO, estas letras se colocan al lado de la que identificaría al locus y así como en las moléculas de clase I, los genes son identificados por un número y los alelos con cuatro dígitos (Corado y Mora de Orta 2000).

La mayoría de los estudios sobre este tema han sido realizados en Europa y Norteamérica. En estas poblaciones, la susceptibilidad a la enfermedad se encuentra asociada con DRB1*0301, DRB3*0101 y DRB1*0401 (Czaja y col., 1997). Además se han reportado los genotipos B8-DR3-DQ2 como los más frecuentes en pacientes italianos con HAI tipo 1, pero significativamente menos frecuente en pacientes norteamericanos (Muratori y col., 2005). En cambio, en la población Alemana se encuentra con mayor frecuencia los subtipos de HLA Cw7, -A2, -B8, -DR3, -DR4 y -DQ2 pero el haplotipo B8-DR3-DQ2, solo se observa en un 27 % de los pacientes (Teufel y col., 2006). En contraste, se encontró una asociación del alelo DRB1*0405 con la susceptibilidad de la enfermedad en población Japonesa (Seki y col., 1990) y Argentina (Pando y col., 1999), DRB1*0404 en población mexicana (Vasquez- García y col., 1998) y

DRB1*1301/DQB1*0601 en niños de sur América (Fainboim y col., 2001 citado en Fortes y col., 2007).

En Venezuela, Fortes y colaboradores (2007) estudiaron 41 individuos mestizos venezolanos diagnosticados con HAI tipo 1 y 111 individuos sanos. Los resultados demostraron que la susceptibilidad a esta enfermedad, está asociada con el alelo DRB1 *1301 y en segundo lugar con el DRB1*0301, tanto en población adulta como en niños, lo cual se asemeja a resultados obtenidos en estudios anteriores realizados a otros pacientes Suramericanos (Argentina y Brazil). Además los autores reportan, un aumento de la frecuencia del alelo DQB1*02 (el cual forma parte del haplotipo ancestral A1-B8-DR3) y una disminución en la frecuencia de HLA-DQB1*04, en los pacientes con respecto a los individuos sanos, el cual puede conferir protección contra HAI tipo 1. En cuanto a alelos de MHC-I, se observó un incremento significativo de la frecuencia del haplotipo A*02-DRB1*1301 en pacientes con HAI, el cual no ha sido descrito en la literatura. Además los resultados mostraron un incremento de la frecuencia del alelo HLA-B*08 en los pacientes (17,07%) con respecto a individuos sanos (8,54%), confirmando lo encontrado en estudios anteriores en este haplotipo (Donaldson y col., 1991, revisado en Fortes y col., 2007). Entre otros alelos que fueron hallados más frecuente en pacientes que en individuos controles, se encuentran HLA-B*18 (19,51%), HLA-B*45 (14,63%) y HLA-B*50 (9,76 %).

Antecedentes

KIR y Asociación a Enfermedades

Las células NK poseen la capacidad de interactuar con componentes del sistema inmune como células dendríticas y células T, esta interacción produce una participación en un amplio rango de enfermedades, incluyendo infecciones virales (como hepatitis C, HIV, Cytomegalovirus), cáncer, y desórdenes autoinmunes como lupus y diabetes tipo I (Khakoo y Carrington, 2006).

La razón de la diversidad de receptores KIR y la contribución de KIRs individuales para la activación de las células NK y células T, no está completamente descrito aún, pero su importancia ha sido bastante resaltada en muchos estudios genéticos (Sumati y Long, 2005). Algunos autores han propuesto modelos de combinaciones específicas KIR-HLA que determinan señales activadoras o inhibitoras en las células NK, lo que afecta la susceptibilidad y resistencia de numerosas enfermedades o modifican el curso clínico de ciertas patologías (Torres-García y col., 2008, Khakoo y col., 2006). Como se ha mencionado anteriormente, las células NK son altamente especializadas en el reconocimiento de los ligandos del MHC clase I, y de las distintas combinaciones de receptores KIR y sus ligandos se derivan distintos fenotipos importantes a nivel de pronóstico clínico, como son la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas, inflamatorias, autoinmunes y cáncer (Torres- García y col., 2008). Las células sanas expresan niveles normales de MHC-I, las células NK reconocen estas moléculas en su superficie. Esta interacción genera una señal inhibitoria, la cual evita que las células NK lisen las células blanco (Williams y col., 2005). En cambio en una enfermedad, la regulación de la expresión de MHC-I (tal como en tumores o infecciones virales) produce la carencia de señales inhibitorias que

permite la activación de las células NK y por ende la lisis de la célula blanco (Williams y col., 2005). Pero la inhibición puede ser superada por una fuerte activación. En resumen, la función de las células NK está determinada por un complejo grupo de receptores inhibidores y activadores y su interacción con los ligandos HLA, los cuales pueden generar una señal inhibitoria o una activadora. El gran polimorfismo de los antígenos HLA ha justificado el estudio en la asociación con diversas enfermedades, demostrándose en muchas de ellas la expresión frecuente de determinados alelos (Cassinotti y col., 2009).

Un análisis realizado en más de 1.000 individuos norteamericanos infectados por el ***Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)***, demostró que aquellos con el gen *KIR3DS1* y un subconjunto de alelos HLA-Bw4 que posee isoleucina en la posición 80 de la cadena pesada (Bw4Ile80), tienen un progreso de la enfermedad más lento que aquellos sin esta combinación KIR-HLA. Por el contrario, el gen activador *KIR3DS1* en ausencia de Bw4Ile80 tuvo un efecto no protector en pacientes con VIH (Martin y col., 2002).

En un estudio realizado por Khakoo y colaboradores (2004) en individuos africanos y americanos con ***Hepatitis C***, se observó un incremento en la frecuencia del receptor KIR2DL3 en combinación con su ligando HLA-C1 en individuos libres de infección. En cambio, en individuos crónicamente infectados se observaron resultados opuestos. El efecto protector de KIR2DL3/HLA-C1 fue observado sólo entre individuos homocigotos para ambos alelos. Si bien KIR2DL3 y su ligando HLA-C1 confieren protección, no se sabe con certeza por qué el gen KIR2DL2 no, aunque posee el mismo ligando; por ello algunos autores plantean la hipótesis que la afinidad de KIR2DL3/HLA-C debe ser más fácil de perturbar que la

de KIR2DL2/ HLA- C1, lo que confiere una activación mas efectiva (Khakoo y col., 2004). Además, un efecto protector de KIR3DS1 y su ligando HLA-B-Bw4 fue observado (al igual que en VIH), aumentando la hipótesis que ciertas combinaciones de KIR-HLA confieren un nivel de protección contra múltiples infecciones virales (Khakoo y col., 2004).

La distribución de los genes KIR activadores fue comparado en 149 pacientes con ***Diabetes Mellitus tipo 1*** y 207 sujetos sanos de los Países Bajos. La presencia de 2 o más genes activadores fue más frecuente en pacientes que en individuos sanos (65.8 vs. 55.1%). Sin embargo, el efecto de los genes KIR en la susceptibilidad a la enfermedad depende de la presencia de ligandos HLA en un individuo. Individuos positivos para *KIR3DL1* en la presencia de alelos HLA-Bw4 (Ile80), fueron menos frecuentes en pacientes que en sujetos control (17.4 vs. 26.6%, respectivamente). Pero estas diferencias no poseen significancia estadística. Tampoco se encontró diferencias significativas entre los pacientes e individuos control, con respecto a los receptores activadores *KIR2DS1*, *KIR3DS1* y los inhibidores *KIR2DL2/KIR2DL3*, en la presencia de sus ligandos HLA. Sin embargo, los autores pudieron observar que *KIR2DS2* en ausencia de *KIR2DL3* y *KIR2DL1* se encuentra con mayor frecuencia en pacientes que en individuos control (54.6 vs. 43.7%), lo que puede contribuir a la patogénesis de diabetes tipo 1. (Van der Slik y col., 2003).

Por otro lado Shastry y colaboradores (2008) estudiaron 98 pacientes con diabetes tipo 1 y 70 sujetos sanos de la población de Letonia, con la finalidad de realizarles la genotipificación de KIR y sus ligandos HLA-C. Ellos encontraron, que la presencia de la combinación *KIR2DL1*, *2DL2* y *2DL3*, cada uno con su respectivo

ligando HLA-C1 o C2, en ausencia de *2DS1* y *2DS2*, confiere un máximo de susceptibilidad (OR=11,50, p=0,004). En cambio, un genotipo con ausencia de genes *2DL2*, *2DS1*, *2DS2* y HLA-C1 confiere un máximo de protección en esta población estudiada (OR= 0,19, p=0.03) (Shastry y col., 2008).

La posible asociación entre el contenido de los genes KIR (en combinación con sus ligandos HLA) y diabetes mellitus tipo 1 fue estudiada en la población Vasca. Los genes *KIR2DS5* (43% en población vasca y 29% en población caucásica, p =0,001), *KIR3DS1* (%=63, caucásicos %=43, p =0,0009) y *KIR2DL2* (%=62, caucásicos %=46, p =0,01), mostraron diferencias significativas con respecto a genes correspondientes a una poblaciones de 698 individuos de raza caucásica. En general, esta población presenta un incremento en la frecuencia de los genes activadores KIR. No se encontró asociación entre el contenido de los genes *KIR* y la susceptibilidad a diabetes tipo 1 (Santin y col., 2006).

Lupus Eritrematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune compleja que afecta a numerosos órganos y tejidos. Se caracteriza por la producción de anticuerpos dirigidos a diversos componentes del núcleo y citoplasma celular, así como a diferentes elementos tisulares. El origen de la enfermedad involucra una variedad de genes, entre ellos el MHC. La predisposición a LES depende del polimorfismo genético de MHC clase II, reportándose alelos como HLA-DR2 y HLA-DR3, quienes pueden conferir susceptibilidad (Lahita y col., 1983).

En el norte de China se realizó un estudio de genotipaje de *KIR* en 62 pacientes con LES y 61 personas sanas como controles. Los genotipos más

frecuentes fueron *KIR 3DP1, 2DL1, 2DP1, 3DL1, 2DL3*, seguido por *2DS4, 2DL5, 3DS1, 2DS2, 2DS5* y *2DL2*. *KIR 2DS1, 2DS3* y *3DP1* tuvieron una menor frecuencia comparados con los otros. La frecuencia de *KIR 3DS1, 2DL2, 2DL5* y *2DL3* fue significativamente más baja en los pacientes que en el grupo control. Con este estudio se puede concluir, que puede haber una asociación entre el polimorfismo de los genes KIR con LES en el norte de China que podría ser investigado posteriormente (Chen y col., 2008).

Por otro lado, Pellet y colaboradores (2007) investigaron los receptores KIR inhibitorios y sus ligandos HLA-C en 304 pacientes caucásicos con LES, y 90 con escleroderma comparado con 416 controles (individuos sanos). La presencia de *KIR2DS1* en ausencia de *KIR2DS2*, estuvo incrementado en ambas patologías. La presencia de *KIR 2DS1* y/o *2DS2* fue más significativo en pacientes que en controles. Estos resultados sugieren que los receptores KIR juegan un papel importante en la susceptibilidad de ambas enfermedades (Pellett y col., 2007).

Otro grupo de investigadores, estudiaron la asociación de los genes KIR con lupus en 200 pacientes y 104 controles alemanes caucásicos. Todos los pacientes mostraron *KIR2DS2* y *KIR2DL2*, pero ambos fueron encontrados en menor frecuencia en pacientes que en controles (47.5% vs 54.8% y 44.5% vs 51.9% respectivamente). *KIR2DS1*, fue más prevalente en pacientes que en controles (40.5% vs 34.6%); sin embargo esta diferencia no fue significativa. *KIR2DS2* (receptor asociado con diferentes desórdenes autoinmunes), fue encontrado con menor frecuencia en pacientes que en controles. La combinación de *KIR2DS2* en ausencia de *2DL2*, fue asociado con escleroderma, pero no fue asociado con LES.

Estos investigadores sugieren que los genes KIR parecen ser solo un factor de riesgo mínimo para LES (Momot y col., 2006).

Todo lo antes mencionado respalda el hecho de la asociación del sistema KIR-HLA con diversas enfermedades, lo cual nos incentiva al estudio de la expresión de los receptores de muerte semejantes a inmunoglobulinas (KIR), en pacientes mestizos venezolanos con diagnóstico de hepatitis autoinmune tipo 1, ya que para dicha enfermedad hasta el momento no se han encontrado reportes referentes a estos receptores y por ende, se desconoce alguna posible asociación a la susceptibilidad o resistencia en esta patología.

Tabla 2 . Asociaciones de los receptores KIR y sus ligandos HLA con diversas enfermedades.

Disease	Association	Effect
Autoimmune/Inflammatory		
1. Psoriatic arthritis	2DS1/2DS2; HLA-Cw group homozygosity	Susceptibility
2. Psoriasis vulgaris	2DS1/HLA-Cw*06	Susceptibility
3. Guttate psoriasis	2DS1;2DL5; KIR haplotype B	Susceptibility
4. Rheumatoid vasculitis	Weak association with 2DS1	Susceptibility (not significant)
5. Scleroderma	2DS2/HLA-Cw*03	Susceptibility
6. IDDM	2DS2+/KIR2DL2-	Susceptibility
7. Behçet's disease	2DS2/HLA-C1	Susceptibility
8. Idiopathic bronchiectasis	2DS2/2DL2	Susceptibility
9. Spondylarthritides	Abnormal 3DL1 expression	Associated with severe eye disease
10. Acute coronary syndromes	2DS1 &/or 2DS2/HLA-C1 homozygosity	Susceptibility
	Increased expression of 3DL2	May contribute to disease pathogenesis
	De novo expression of 2DS2/DAP12 in CD4+ T cells	May contribute to disease pathogenesis
Infectious		
1. HIV-1	3DS1/HLA-B-Bw4 80I B*57 supertype with Bw4-80I epitope/3DL1	Slows progression Slows progression
2. HCV	i. 2DL3/HLA-C1 homozygosity ii. 3DS1/HLA-Bw4 3DS1/HLA-Bw4 80I	Resolution of infection Resolution of infection Protection from development of hepatocellular carcinoma
3. Reactivation of CMV following bone marrow transplantation	>1 activating KIR in donor	Reduced risk of CMV reactivation in recipient.
4. <i>P. Falciparum</i>	3DL2*002	High response to iRBC
Cancer		
1. Malignant melanoma	2DL2/2DL3; HLA-C1	Susceptibility
2. Leukemia	i. 2DL2 ii. AB1 and AB9 KIR phenotypes	Susceptibility
3. Cervical cancer	3DS1/absence of HLA-C2 &/or HLA-Bw4 i. Genotype 10 ii. 2DL5*002	Susceptibility Susceptibility Protection

(Tomado de Bashirova y col., 2006).

Objetivos

Objetivo general:

➤ Estudiar la posible asociación del sistema KIR-HLA-I con la susceptibilidad a Hepatitis Autoinmune tipo I en la población mestiza venezolana.

Objetivos Específicos:

➤ Determinar la frecuencia de los genes KIR activadores (*2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1*), *inhibidores (3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5)* y dos pseudogenes (*3DP1, 2DP1*) en pacientes con diagnóstico de HAI tipo 1.

➤ Determinar los alelos HLA-C en pacientes con HAI tipo 1.

➤ Estudiar la posible asociación entre la distribución de genes KIR y sus ligandos HLA-I en pacientes con HAI tipo 1 respecto a población sana venezolana.

Materiales y Métodos

1.-Población estudiada.

La investigación estuvo conformada por un grupo de 52 pacientes mestizos venezolanos de tercera generación, los cuales fueron seleccionados para el estudio de susceptibilidad de los alelos HLA en individuos con HAI tipo 1, realizado por Fortes y colaboradores (2007) en el Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, UCV, a quien le agradecemos por permitirnos utilizar sus muestras. Para ello se cumplieron con los criterios de diagnóstico citados en el anexo 1 y aceptación de los pacientes de la realización del estudio (anexo 2 .Consentimiento informado). El proyecto fue aprobado por el comité de bioética del Instituto de Inmunología.

Criterios de inclusión:

- 1.- Individuos mestizos venezolanos de tercera generación con diagnóstico de Hepatitis Autoinmune tipo 1.
- 2.- Individuos que cumplan con los criterios de diagnóstico de Hepatitis Autoinmune tipo 1, citados en el anexo I.

Criterios de exclusión:

- 1.- Individuos que presenten infección crónica por el virus de hepatitis B o C.
- 2.- Grupo de individuos que no cumplan con los criterios de inclusión.

Como grupo control se utilizó la data del genotipaje de KIR y HLA clase I, obtenida a partir de 205 individuos sanos mestizos venezolanos de tercera generación (Conesa y col., en revisión).

2.- Aislamiento de ADN genómico.

Se aisló el ADN genómico mediante el estuche de la Compañía Qiagen® (QIAamp DNA Mini Kit), a partir de la capa de blancos extraída de la sangre no coagulada de los individuos incluidos en el estudio. Este se obtuvo mediante centrifugación de la sangre a 2500 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se pudieron distinguir 3 fracciones: la capa superior; donde se ubicó el plasma, la capa intermedia; que representa la capa de blancos y la capa inferior; donde se ubicaron los eritrocitos en forma concentrada .

El ADN se aisló mediante centrifugación y por afinidad a las columnas QIAamp, lo cual permitió su purificación, obteniendo un promedio de 50 ug de ADN a partir de 200 ul de concentrado leucocitario, libre de contaminación por proteínas. Este procedimiento comprendió cuatro pasos: *lisis celular*; mediante proteasas, *unión del ADN a la membrana de la columna*; ajustando las condiciones de la solución para que permita una unión óptima, *lavados* y por último la *elución* del ADN; con agua o buffer de elución (Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,5 mM; pH 9,0).

El procedimiento para el aislamiento del ADN se detalla a continuación: Se agregó en un tubo de microcentrífuga de 1,5ml, 20ul de Proteinasa K (>600mAU/ml) y 200 ul de la muestra, luego se procedió a añadir 200ul de buffer de lisis (AL), se mezcló con ayuda del vortex por 15 segundos (esta mezcla ayuda a la liberación total del ADN genómico). Posteriormente se procedió a incubar la mezcla a 56°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 6000x g por un minuto y se agregó a la mezcla 200ul de etanol (96-100%). Se mezcló de nuevo con el vortex por 15 segundos y se centrifugó rápidamente. La mezcla anterior se colocó en una QIAamp Spin column contenida en un tubo de 2 ml y se centrifugó a 6000x g por 1

minuto. Se descartó el filtrado y se agregó a la misma columna, 500 µl de Buffer de lavado (AW1), el cual se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto, se descartó el filtrado y se agregaron 500 µl de Buffer de lavado (AW2), el cual se centrifugó a 20000 x g durante 3 minutos; posteriormente, la columna se centrifugó de nuevo a 20000 x g durante 1 minuto. Luego se descartó el tubo anterior, y se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga de 1,5ml. Posteriormente, se agregó a la columna 200ul de buffer de elución (AE) o agua destilada libre de nucleasas, se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 minuto y se procedió a su centrifugación a 6000 x g durante 1 minuto.

La estimación de la concentración de ADN de la muestra, se realizó mediante espectrofotometría (Gene Quant II, Pharmacia Biotech) por medición de la absorbancia a 260 nm y la pureza, se calculó dividiendo la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280nm. Finalmente se realizaron diluciones de las muestras de ADN, con la finalidad de ajustar su concentración a 20 ng/ul.

3.-Tipificación de los Genes KIR

3.1.-Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (tomado de Gómez-Lozano y Vilches, 2002, modificado por Conesa y col, en revisión).

Se utilizó la PCR-SSP con el fin de realizar la amplificación directa de los genes KIR, en las muestras de ADN extraído de los pacientes en estudio, utilizando los iniciadores específicos (tabla 2) para cada gen KIR tanto inhibidores (3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5) como activadores (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1), y dos pseudogenes (3DP1, 2DP1). Como control

interno se usó el gen de la hormona de crecimiento GH1. La mezcla de reacción para un volumen de 25 μ l se realizó agregando 9,85 μ l de agua estéril, 2,5 μ l de Buffer 10x (Tris-HCl 200mM, pH8,4 y KCl 500mM), 2,50 mM KCl, 0,2 mM de Tris-HCl, 0,2 mM de dNTPmix, 3,3 mM de MgCl₂, 0,5 μ l de los iniciadores sentido y antisentido de cada KIR (concentración final indicada en la tabla 2), 0,5 mM de cada iniciador GH1, 1 unidad de Taq polimerasa. Por último, se agregaron 100 ng de cada muestra de ADN, se mezcló en el vortex y se centrifugó. Todo este procedimiento se realizó en un ambiente estéril para evitar la acción de las DNAsas. La PCR se realizó en el termociclador MJ Research PTC-200, bajo las siguientes condiciones: 2 minutos a 95 °C; 10 ciclos de 20 seg a 94°C, 10 seg a 55 °C y 1 min 30 seg a 72 °C; 20 ciclos de 20 seg a 94 °C, 20 seg a 61°C y por último, 1min 30 seg a72 °C.

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación de los receptores KIR.

Oligonucleótidos	Sentido. (Secuencia 5'-3')	Cf (uM)	Antisentido. (Secuencia 5'-3')	Cf (uM)	Amplificó n (pb)
KIR2DL1	ccatcagtcgcatgagc	0,5	ccactcgtatggagagtcac	0,1	1903
			aatgttccggtgaccttggt	0,2	1818
KIR2DL2	acttccttctgcacagagaa	1	gccctgcagagaacctac a	1	1868
KIR2DL3	acagagaagggaagttaa g ccttcacgctggtgctg	1 0,3	ccctgcagagaacctacg	1	1858
			caggagacaacttggatc a	0,3	812
KIR2DL4	aggacaagcccttctgc	1	ggaaagagccgaagcat c	1	1395
KIR2DL5	tgctcagaggaggacat	1	ccggctgggctgagagt	1	1151
KIR3DL1	ccatcgggtcccatgatgct	2,5	agagagaaggtttctcatat g	2,5	1690
KIR3DL2	cgggtcccttgatgcctgt	0,5	gaccacacgcagggcag	0,1	1948
KIR3DL3	tggtcaggacaarcctt	1	ccgacaactcatagggta	1	1824
KIR2DS1	tctccatcagtcgcatgar	2,5	agggccagaggaaagtt	2,5	1839
KIR2DS2	tgcacagagaggggaagt a	1	cacagctctctctgccaa	1	1775
KIR2DS3	tcactccccctatcagttt	2,5	gcatctgtaggttctctctcc t	5,2	1800
KIR2DS4	ctggccctcccagggtca	1	Ggaatgttccggtgatgc	1	1981
KIR2DS5	agagaggggacgtttaacc	1	ggaaagagccgaagcat	1	1952

			c		
KIR3DS1	ggcagaatattccaggagg	1	aggggtccttagagatcca	1	1765
KIR2DP1	tctgttactcactccccca	1	ggaaagagccgaagcat	1	1825
			c		
KIR3DP1	ccatgtcgctcatggtcg	1	tgaccacccagtgagga	1	361/183
	agggttcttcttgctgc	1			4
					1047
GH1	cttccaaccattccctta	0,5	cggatttctgtgtgttc	0,5	450

Cf= concentración final medida en micromoles (μ M). pb = tamaño del amplicón resultante medido en pares de bases. (Tomado de Gómez-Lozano y Vilches, 2002).

3.2-Electroforesis en geles de Agarosa.

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para visualizar la presencia o ausencia de los genes KIR se realizó una solución de agarosa al 2% en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA). Para la elaboración del gel, se pesó 1 gramo de agarosa y se agregó en una fiola con 50ml de buffer TBE 1X, lo cual se calentó en el microondas hasta que se haya disuelto toda la agarosa en el buffer y la solución se observe transparente. Esta mezcla se agregó en cubetas especiales para geles de agarosa con el uso de peines, los cuales formaron bolsillos donde se cargó la muestra. El gel se dejó reposar por unos 15 minutos o hasta que la agarosa polimerice, luego se retiraron los peines y se colocó el gel en una cámara de electroforesis que contiene buffer TBE 1X. Posteriormente, se cargaron los bolsillos mezclando 5 μ l de buffer de carga con 10 μ l de cada producto de PCR y se corrió por 1 hora a 100 mV. Además, se cargaron 3 μ l de peso molecular de 1 Kb y un control negativo para la PCR (mezcla sin muestra de ADN), para verificar que no exista ninguna contaminación. El gel se reveló con bromuro de etidio por 10min y se lavó en agua

destilada por 5 min. Por último, se reveló el gel por fotodocumentación mediante el uso del transluminador UV (UVP, UV transilluminator) y la cámara Kodak Digital Science, electrophoresis documentation and analysis system 120.

4.-Tipificación de HLA

Este procedimiento se realizó mediante la hibridación con sondas específicas de Oligonucleótidos (PCR-SSO) usando el estuche comercial de Dynal Reli™ SSO HLA Typing Kit, que permite una resolución de baja a media para la tipificación de HLA, bien sea tipo A, B o C. La técnica consiste en la desnaturalización de las cadenas de ADN empleando una solución de hidróxido de sodio. El ADN desnaturalizado marcado con biotina, hibrida con las sondas que se encuentran inmovilizadas sobre una tira de nitrocelulosa. Luego se procede a la detección de la hibridación, realizada mediante un método colorimétrico que emplea un conjugado entre la estreptavidina y una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa). Al colocar el sustrato de la enzima se produce el desarrollo de color en aquellas sondas donde ocurrió la hibridación con el ADN amplificado. La interpretación del patrón de hibridación obtenido se realiza mediante el programa informático Dynal AutoRELI 48 desarrollado por el estuche comercial.

4.1.-Amplificación mediante PCR.

En cada tubo de PCR se agregaron 15 µl de una solución de Mg Cl₂ 6 mM, 30 µl de la mezcla de reacción (contiene buffer, dNTPs, iniciadores biotinilados específicos y taq polimerasa) y 15 µl de ADN (13-15 ng/ µl). Posteriormente, se procedió a colocar los tubos en el termociclador y someter las muestras al siguiente programa de amplificación: 15 seg a 95 °C, 45 seg a 60 °C, 15 seg a 72 °C por 35 ciclos y luego 5 min a 72 °C y se mantiene a 15 °C. Una vez finalizado el programa,

se procedió a agregar 60 µl de la solución desnaturalizante en cada reacción y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente; con la finalidad de permitir la desnaturalización completa. Este amplicón fue guardado a 2-8 °C hasta el momento de su uso.

4.2.-Ensayo de Hibridación y Detección.

Se calentó el buffer de Hibridación y el Buffer astringente de lavado en un baño a 50 °C, esto con la finalidad que todos los precipitados sólidos puedan estar en solución. Luego se procedió a la identificación de cada tira. Se colocó cada tira en el pozo de la bandeja de hibridación y se agregaron 5 ml de buffer de hibridación a cada pozo mas 80 µl de amplicón y se incubó durante 30 minutos en una placa de calentamiento (DynaL AutoRELI™ 48 Instrument) a 50°C con movimiento. Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el contenido de cada pozo, y se procedió a agregar 5 ml de buffer de lavado (a cada pozo) a temperatura ambiente, el cual se incubó durante 1 minuto. Se descartó la solución y se repitió el procedimiento con 5ml de buffer astringente de lavado durante 15 minutos a 50 °C. Posteriormente, se descartó la solución de la bandeja y se agregaron 5 ml a cada pozo de la solución del conjugado, la cual se incubó por 15 minutos. Al culminar el tiempo se descartó la solución contenida en los pozos, y se procedió a realizar dos lavados de 5 minutos cada uno con Buffer de lavado. Se agregó el buffer citrato a cada pozo (5ml) y se incubó por otros 5 minutos, se descartó y se agregaron 5 ml del sustrato a cada pozo, lo cual se dejó por un tiempo de 10 minutos. En este paso se comenzaron a observar las bandas en cada tira. Posteriormente, se descartó el sustrato y se lavaron dos veces los pozos con agua destilada (incubación 5 minutos). Por último, se agregaron 5 ml de Buffer citrato y las tiras

están listas para la interpretación mediante el programa informático Dynal AutoRELI 48.

5.- Análisis estadístico.

Las frecuencias alélicas, fenotípicas y genotípicas se calcularon mediante conteo directo. La frecuencia fenotípica, es la proporción de sujetos de una población (pacientes o controles) portadores de un determinado antígeno. La frecuencia alélica, es el número de veces que un alelo dado aparece en una población, dividido por el número total de alelos encontrados en esa misma población. La frecuencia genotípica, es la proporción de sujetos de una población (pacientes o controles) portadores de un determinado genotipo. Estas frecuencias fueron calculadas en porcentajes. La estimación de la frecuencia génica (f) se calculó usando la fórmula descrita por Hsu y colaboradores, 2002 $f=1-\sqrt{1-F}$.

La asociación del alelo (HLA-I o KIR) con la condición de estudio (HAI) se estimó utilizando la tabla de contingencia 2x2, la intensidad de la asociación se calculó como "Odds ratio" (OR) y su intervalo de confianza (IC) (95 %) se estimó a través del programa de computación GraphPadPrism, usando la data de KIR y HLA-I determinada en sujetos sanos venezolanos de tercera generación estudiado por Conesa (2009). Es importante señalar, que cuando un OR es significativo, su intervalo de confianza no incluye al 1, que es el valor esperado cuando hay independencia y que se obtiene cuando la proporción de alelos entre pacientes y controles es igual. En este estudio se consideran relevante los OR con intervalos de confianza significativos por lo menos al 95% ($p<0,05$).

La significancia (p) de la asociación de las frecuencias de alelos entre pacientes y controles, fue estimada por el test exacto de Fisher, la cual es muy apropiada para muestras pequeñas. Se considera significativo un valor de $p < 0,05$.

Por otra parte, para comparar porcentajes, fue preciso dividirlos previamente por 100 para transformarlos en proporciones y así poder utilizar la Prueba de Diferencias entre Proporciones, que sostiene como hipótesis nula que ambas proporciones son iguales y por lo tanto, su diferencia no es estadísticamente distinta de cero entre los dos grupos que se desean comparar. Para realizar esta prueba es preciso conocer los porcentajes y el número total de individuos presentes en cada grupo. Si como resultado se obtienen niveles de significancia inferiores a 0,05, entonces la diferencia es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

Resultados

La función de las células NK está determinada por el grupo de receptores KIR y su interacción con los ligandos HLA, los cuales pueden generar una señal inhibidora o una activadora que confiera susceptibilidad o resistencia a diferentes enfermedades. Lo antes mencionado nos incentivó al estudio de la presencia o ausencia de los receptores KIR, en 52 pacientes mestizos venezolanos de tercera generación, con diagnóstico de Hepatitis Autoinmune tipo 1, ya que en dicha enfermedad hasta el momento no se han encontrado reportes referentes a estos receptores y por ende, se desconoce alguna posible asociación a la susceptibilidad o resistencia en esta patología.

1.-Distribución de genes KIR:

Con la finalidad de observar la presencia o ausencia de cada gen y por ende conocer las características de genotipaje en cada individuo incluido en el grupo de pacientes con diagnóstico de HAI, las muestras de ADN, luego de ser analizadas su concentración a través de la lectura en el espectrofotómetro, fueron sometidas a una amplificación en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos (PCR-SSP). Tanto en la figura 6 como en la 7, se muestra un registro fotográfico en gel de agarosa al 2 %, de los amplificados obtenidos para el gen *KIR2DL2* y el *KIR2DS2*, en el cual todas las muestras, menos el último carril (10 en la figura 6 y 12 en la figura 7), poseen una banda ubicada entre 300 y 400 pb que representa al control interno (GH1). La diferencia entre los geles es que la figura 6 pertenece a un registro fotográfico del gen *2DL2*, gen *KIR* inhibidor mientras que la figura 7 muestra un registro de la amplificación del gen *2DS2*, gen *KIR* activador. En la figura 6 observamos que los carriles 2, 4, 6, 7 y 9 poseen una banda de 1868 pb que indica que estas muestras son positivas para el gen inhibidor *2DL2*

(Gómez-Lozano y Vilches, 2002). El control negativo, en el carril 10, para la reacción (mezcla de reactivos sin ADN) no mostró ninguna banda de amplificación. Por otra parte, las muestras de los carriles 2, 6, 7 y 9 de la figura 7 son positivas para el gen *2DS2* debido a que se observa una banda de aproximadamente 1775 pb lo que se corresponde con el amplicón reportado para este gen por Gómez-Lozano y Vilches (2002), todas las demás muestras al no poseer esta banda son negativas para este gen. El carril 12 representa el control negativo de esa reacción.

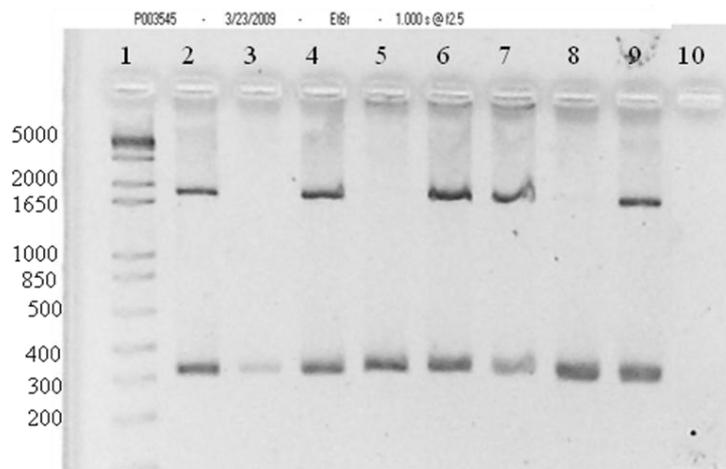


Fig. 6.- Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 2 % para el gen *2DL2*. Marcador de peso molecular de 1kb (1), Muestras positivas para el gen *2DL2* (2,4,6,7,9) banda aproximada de 1868pb ; control negativo (10).

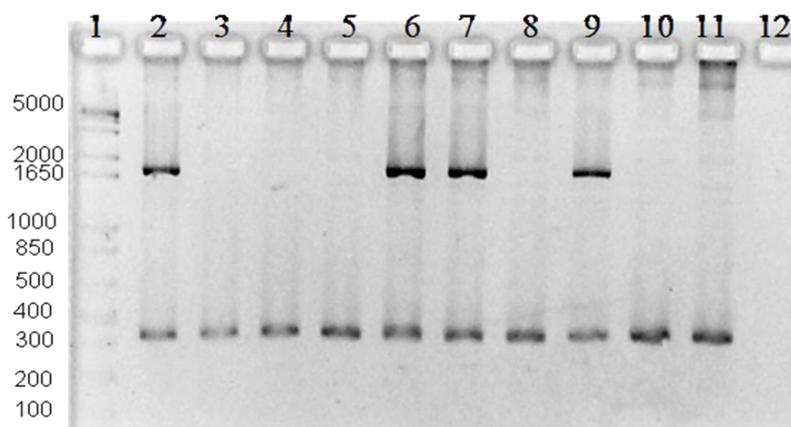


Fig. 7.- Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 2 % para el gen *2DS2*. Marcador de peso molecular de 1kb (1), Muestras positivas para el gen *2DS2* (2,6,7,9) banda aproximada de 1775pb ; control negativo (12).

peso molecular de 1kb (1), Muestras positivas para el gen 2DS2 (2,6,7,9), banda de 1775pb aproximadamente; muestras negativas para el gen 2DS2 (3-5,8,10,11); control negativo (12).

El análisis de la distribución de los genes *KIR*, nos mostró que el conjunto de genes *KIR* inhibidores poseen una mayor frecuencia que los genes activadores, lo cual ocurre en forma similar tanto en individuos sanos (86,22% inhibidores contra 48,1% de activadores), como en pacientes (83,9% inhibidores contra 48,4% de activadores), como se muestra en la figura 8. Sin embargo al realizar una prueba de proporciones, para analizar las posibles diferencias entre ambas poblaciones, las *p* obtenidas no fueron significantes. Al estudiar la frecuencia de menos de 2 genes *KIR* activadores y la de más de 2 de ellos (figura 9), observamos más de dos genes activadores con mayor frecuencia en pacientes (75%) que en individuos sanos (67,09%). En cambio menos de dos genes activadores fueron observados en mayor proporción en población sana (33,54%) con respecto a los pacientes (25%), sin embargo al realizar una prueba de chi-cuadrado no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos.

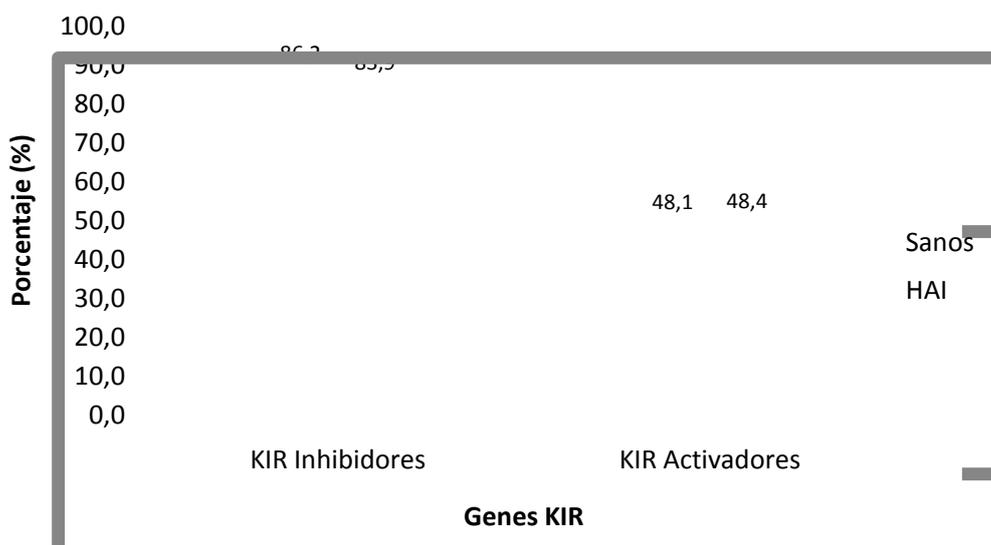


Fig . 8.- Distribución de la frecuencia del total de los genes *KIR* inhibidores y activadores. Se compara población sana con individuos con diagnóstico de HAI tipo 1. Se observa una mayor frecuencia de genes *KIR* inhibidores que activadores. Se realizó una prueba de proporción entre genes

inhibidores en ambas poblaciones arrojando un valor de p de 0,1 y en genes *KIR* activadores una p de 0,33. Se considera significativo $p < 0,05$.

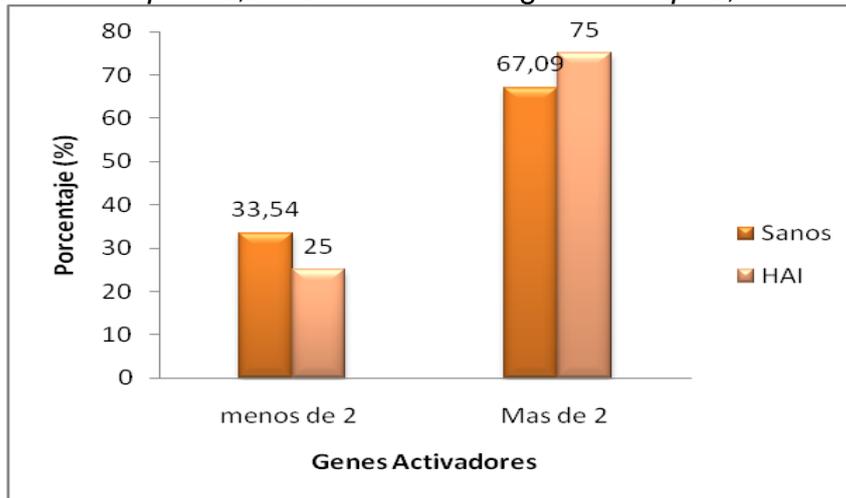


Fig . 9.- Distribución de la frecuencia de individuos con menos de 2 genes *KIR* activadores e individuos con mas de dos genes activadores. Se compara la población sana ($n=205$) con individuos con diagnóstico de HAI tipo 1 ($n=52$). Se realizó una prueba de Ji-cuadrado y se observaron p no significantes de 0,32 para la presencia de menos de 2 genes activadores y $p = 0,36$ en mas de dos genes activadores. Se considera significativo $p < 0,05$.

En la tabla 4 se muestra la distribución de la frecuencia de los genes *KIR* en la población analizada, mestiza venezolana de tercera generación, con diagnóstico de HAI tipo 1. Todos los genes *KIR* fueron observados al menos en un individuo, es decir, ninguno estuvo ausente para toda la población. Además genes *KIR* como *2DL4*, *3DL2*, *3DL3* y *3DP1* fueron observados en el 100 % de los individuos tanto de población sana como enfermos ($f=1$). Las frecuencias más altas se encontraron en genes como *2DL1*, *3DL1* y *2DP1*. Sin embargo, *2DL1* se encuentra en menor frecuencia en pacientes (90,38 %, $f = 0,7$) que en individuos sanos (97, 07%, $f=0,83$), al igual que *2DP1* donde se observó un 88,46 % ($f=0,7$) de individuos con HAI que poseían el gen, contra 97,07 % ($f=0,83$) de individuos sanos. Por el contrario, *3DL1* estuvo presente en el 96, 15 % ($f= 0,8$) de la población enferma y sólo en el 90,24 % ($f=0,69$) de los individuos sanos. El gen con menor frecuencia encontrado fue *KIR2DS3*, el cual arrojó una frecuencia génica baja ($f= 0,1$) en ambas poblaciones estudiadas, presenciándose en el 25% de personas que padecen HAI y el 20,98 % de población sana. La asociación entre los genes *KIR* y

la condición de estudio (HAI) se estimó a través de una tabla de contingencia 2X2, la intensidad de la asociación se midió como Odds Ratio (OR) y la significancia de la asociación se calculó mediante una prueba de Fisher. En la mayoría de los casos, se observaron OR cercanos a uno. Los menores valores de OR arrojados ($OR < 0,40$), fueron encontrados en genes *KIR* como *2DL1* (0,28), *2DL3* (0,35) y *2DP1* (0,23), lo que indica que estos pueden ser tomados como factores que confieren protección a esta enfermedad, ya que al realizarles una prueba de Fisher para determinar la significancia de la asociación, arrojaron valores de $p < 0,05$, indicando una diferencia significativa. Por el contrario, el gen *3DL1* arrojó un OR de 2,7, lo que podría indicar que este podría actuar como un factor de riesgo para la enfermedad en estudio, sin embargo no se obtuvo diferencias significativas ($p=0,266$).

Con el objeto de analizar la frecuencia de los genes *KIR 2DL2* y *2DL3* en condición homociga, debido a que estos se segregan juntos, en la tabla 5 se observó que tanto *2DL2/2DL2* (17,31% en pacientes vs 6,8% en individuos sanos) como *2DL3/2DL3* (53,85% en pacientes vs 50,73% en población sana) se encuentran con mayor frecuencia en población con HAI tipo 1 que en individuos sanos. Además *2DL2* homocigo arrojó el mayor valor de OR (2,85) con una p significativa ($p=0,0276$), lo que podría indicar que individuos que posean este gen en condición homociga, son más susceptibles a padecer la enfermedad que aquellos que no la posean. Por otra parte, individuos *2DL2/2DL3* fueron más frecuentes en población sana (42,44%) que en individuos que padecen de HAI tipo 1 (30,77%) pero al realizar las pruebas estadísticas, se obtuvo un $OR=0,60$ y no se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,15$).

Además con la finalidad de observar si HAI tipo1 se encuentra relacionada con la edad estudiamos la frecuencia de los genes *KIR* en individuos mayores de 18 años (Anexo 4.Tabla 14), donde encontramos que los genes que fueron observados como significantes en la tabla de frecuencia de *KIR* (*2DL1*, *2DL3*, *2DP1*) (tabla 4), también arrojaron diferencias significativas en individuos mayores de 18 años. Los valores de OR arrojados fueron mucho menores cuando solo nos restringimos a individuos mayores 18 años, así las p fueron mas significantes para cada uno de los genes (Anexo 4.Tabla 14), lo que podría indicar que individuos mayores de esta edad con la ausencia de estos genes, son más susceptibles a HAI que individuos que los posean. Por otro lado, comparamos la frecuencia de los genes en individuos menores de 18 años y mayores de esa edad con diagnóstico de HAI tipo 1 y no se encontró ninguna diferencia significativa. Así como se estudió la distribución de los genes *KIR* según la edad de los individuos, también se deseó destacar la frecuencia de los mismos divididos por sexo, debido a que este tipo de patología posee mayor incidencia en mujeres que hombres. En anexo 6, tabla 16 se observó una mayor frecuencia de los genes *2DL1*, *2DL3*, *2DS1*, *3DS1*, *2DP1* en el sexo masculino. Pero el número de pacientes hay que tomarlo en cuenta, ya que en este grupo estudiado tenemos 6 hombres y 46 mujeres (figura 10), así este grupo masculino no es el adecuado para analizar estadísticamente estos resultados. Sin embargo, realizamos un análisis entre individuos femeninos y masculinos de población sana (Anexo 5, tabla 15), donde no se consiguieron diferencias significativas, además comparamos los individuos del sexo masculino con HAI tipo 1 con aquellos sanos y no se encontraron diferencias significativas (Anexo 7, tabla 17).

Tabla 4. Distribución de la frecuencia de genes KIR.

Genes	HAI	f	Sanos	f			
KIR	n (%)	HAI	n (%)	Sanos	OR	p	95% IC
2DL1	47 (90,38)	0,7	199 (97,07)	0,83	0,28	0,0488	0,083-0,97
2DL2	25 (48,08)	0,3	101 (49,27)	0,29	0,9534	1	0,5185-1,753
2DL3	43 (82,69)	0,6	191 (93,17)	0,74	0,35	0,0276	0,1423-0,8619
2DL5	28 (53,85)	0,3	123 (60,00)	0,37	0,7778	0,4343	0,4214-1,435
3DL1	50 (96,15)	0,8	185 (90,24)	0,69	2,703	0,2662	0,6109-11,958
2DS1	21 (40,38)	0,2	88 (42,93)	0,24	0,9007	0,7564	0,4848-1,673
2DS2	31 (59,62)	0,4	102 (49,76)	0,29	1,491	0,2175	0,8035-2,766
2DS3	13 (25,00)	0,1	43 (20,98)	0,11	1,256	0,5734	0,6160-2,560
2DS4	47 (84,62)	0,7	184 (89,76)	0,68	0,6277	0,3265	0,2608-1,511
2DS5	19 (36,54)	0,2	84 (40,98)	0,23	0,8294	0,6356	0,4419-1,556
3DS1	23 (44,23)	0,3	90 (43,90)	0,25	1,013	1	0,5490-1,871
2DP1	46 (88,46)	0,7	199 (97,07)	0,83	0,2312	0,0179	0,07128-0,7496

HAI= 52 individuos Sanos= 205 % = frecuencia. f= frecuencia génica.
 OR= Odds Ratio. IC= Intervalo de confianza.

Tabla 5. Frecuencia de los genes KIR en su forma homóciga 2DL2/2DL2, 2DL3/ 2DL3 y la combinación 2DL2/2DL3.

	HAI		Sanos				95% IC
	n=52 (%)	f	n=205 (%)	f	OR	P	
2DL2/2DL2	9 (17,31)	0,09	14 (6,8)	0,035	2,85	0,0276	1,160-7,028
2DL3/2DL3	28 (53,85)	0,32	104(50,73)	0,3	1,13	0,756	0,615-2,086
2DL2/2DL3	16 (30,77)	0,17	87 (42,44)	0,24	0,60	0,1541	0,314-1,156

F (%) = frecuencia. OR= Odds Ratio. f= frecuencia génica . IC= Intervalo de confianza.
 2DL2/2DL2= dos alelos del gen 2DL2 2DL3/2DL3= dos alelos del gen. 2DL3.
 2DL2/2DL3= un alelo del gen 2DL2 y otro del gen 2DL3.

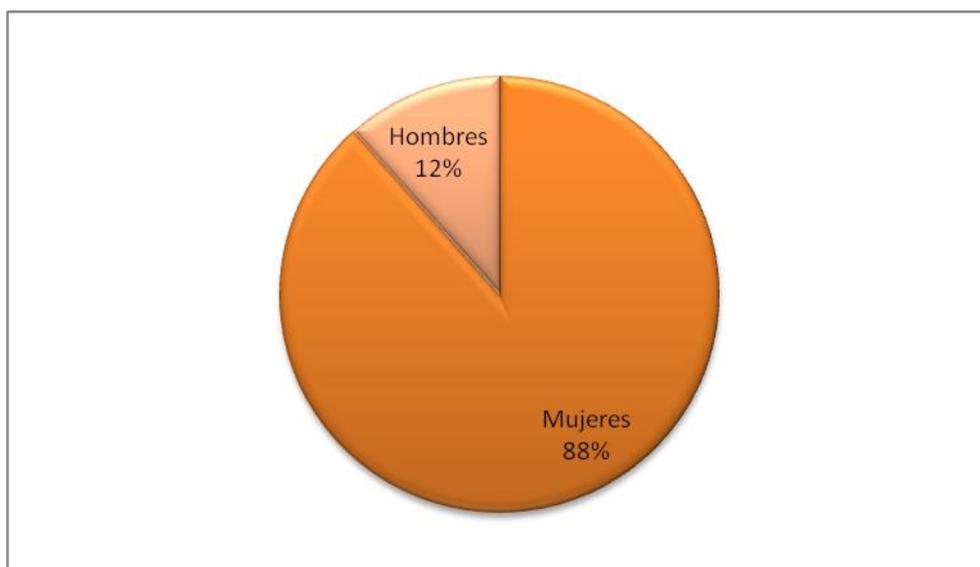


Fig.10.-Porcentaje de pacientes por sexo. Se muestra el porcentaje de individuos femeninos (n=46, 88%) y masculinos (n=6, 12%) en individuos mestizos venezolanos con HAI tipo 1. Se observa una mayor frecuencia de mujeres que de individuos del sexo masculino.

El análisis de la herencia y estructura genómica de los genes KIR es complejo dado que se segregan en haplotipos conformados por presencia o ausencia de genes, lo cual genera diversos genotipos. En nuestro grupo de pacientes HAI encontramos 24 genotipos, de los cuales 23 fueron previamente reportados por Yawata y colaboradores, Du y colaboradores, Rudnick y colaboradores o Hsu y colaboradores (figura 11). En la figura 12 se representan los 4 genotipos más frecuentes encontrados en nuestro estudio, el primer genotipo (21,15% en HAI tipo 1 y 25,85 en población sana), está conformado por la presencia de sólo 7 genes *KIR*, de los cuales 6 son inhibidores (*2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*) y sólo uno es activador (*2DS4*), el cual arrojó un valor de OR de 0,77 sin asociación significativa ($p=0,59$) al ser comparado con individuos sanos (figura 12). Este genotipo se corresponde con el más frecuente encontrado en población sana y en el estudio de Yawata y colaboradores (2002). Así el genotipo 4, el segundo más frecuente encontrado, estuvo presente en el 7,69% de

la población enferma y sólo en el 13,66% de la población sana, éste arrojó un valor de OR de 0,53 ($p=0,33$). En este genotipo está representado por la presencia de 11 genes *KIR*; 7 inhibidores (todos menos *2DL2*) y 4 *KIR* activadores (menos *2DS2* y *2DS3*). Por otra parte el genotipo 2, conformado por la presencia de todos los genes inhibidores menos *2DL5* y los genes activadores *2DS2* y *2DS4* fue observado en 7,69% de los individuos con HAI tipo 1 y en el 11,22% de los individuos sanos, al realizar el análisis de OR arrojó un valor de 0,66. Por último se observó, en el genotipo 8, el valor de OR más alto (1,06) dentro de esta comparación de genotipos. Este genotipo presenta todos los genes *KIR* menos el *2DS3* y se encontró en el 7,69% de la población con HAI tipo 1 y en el 7,32% de la población. Ninguno de estos genotipos descritos hasta ahora arrojaron diferencias significativas.

Nosotros encontramos un genotipo que no se correlacionaba con ningún genotipo reportado en los trabajos revisados, lo cual lo consideramos como un posible nuevo genotipo encontrado (genotipo 1⁵, figura 11). Este genotipo se caracterizó por la presencia de 11 genes, de los cuales 7 representan genes inhibidores y 4 son activadores. Cabe destacar que algunos genotipos muestran la presencia de hasta 13 genes *KIR* (genotipo 8, 3 y 14, figura 11). Además se observaron genotipos presentes sólo en pacientes como el 14 (5,77%); constituido por la presencia de todos los genes *KIR* menos el *2DL3* y el genotipo 90 (3,83%); el cual presenta todos los genes inhibidores menos *2DL2* y cuatro genes activadores (menos *2DS3* y *2DS4*). Además se llegó a observar la presencia de todos los genes activadores (genotipo 14). A estos genotipos no se le pudo realizar un análisis estadístico certero debido al número de muestras obtenido y las frecuencias tan bajas que sesgarían los resultados, por lo que recomendamos

aumentar el número de muestras para poder seguir considerando que las tendencias que obtuvimos son las adecuadas.

Genes KIR	2DL					3DL			2DS					3DS	genes	HAI n=52	%	Sanos	
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1				n=205	%
1 ¹	■				■										7	11	21,15%	53	25,85%
4 ¹		■													11	4	7,69%	28	13,66%
2 ¹					■										9	4	7,69%	23	11,22%
8 ¹															13	4	7,69%	15	7,32%
16 ¹	■		■		■				■						7	3	5,77%	2	0,98%
6 ¹														■	13	3	5,77%	7	3,41%
14 ¹			■												13	3	5,77%	0	0,49%
21 ¹		■			■				■						8	3	5,77%	1	0,49%
90 ¹		■									■	■			11	2	3,85%	0	0,00%
12 ¹		■								■					11	1	1,92%	1	0,49%
33 ¹									■	■					10	1	1,92%	1	0,49%
7 ¹			■												10	1	1,92%	5	2,44%
3 ¹															11	1	1,92%	11	5,37%
57 ¹		■													10	1	1,92%	0	0,00%
17 ¹					■						■	■			11	1	1,92%	6	2,93%
104 ¹	■		■												11	1	1,92%	2	0,98%
100 ¹		■			■							■	■		10	1	1,92%	0	0,00%
32 ¹									■			■			11	1	1,92%	3	1,46%
40 ¹										■					12	1	1,92%	1	0,49%
AG ²		■			■										6	1	1,92%	0	0,00%
Z ²	■	■	■		■										6	1	1,92%	0	0,00%
30 ³		■								■		■			10	1	1,92%	0	0,00%
15 ⁴		■			■									■	8	1	1,92%	0	0,00%
1 ⁵		■												■	11	1	1,92%	0	0,00%

Fig. 11.- Genotipos de KIR de la población mestiza venezolana afectada con HAI tipo 1 y su comparación con individuos sanos. Los cuadros de color negro representan la presencia de los genes y los cuadros blancos la ausencia de los mismos. Se muestran los 24 genotipos encontrados en orden de frecuencia en la población estudiada (HAI n= 52) y su comparación con población sana (n=205), de los cuales 19 se corresponden con el modelo reseñado por Yawata y col., 2002¹ (n=989), 2 con el de Hsu y col., 2002² (n=85), 1 con el de Rudnick y col., 2006³ (n=289) y 1 con el de Du y col., 2007⁴ (n=759). Además un nuevo genotipo fue descrito⁵.

Genes KIR	2DL					3DL			2DS					3DS	genes	HAI		Sanos		OR	p
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1		n=52	%	n=205	%		
1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7	11	21,15%	53	25,85%	0,77	0,59
4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	11	4	7,69%	28	13,66%	0,53	0,35
2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9	4	7,69%	23	11,22%	0,66	0,61
8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13	4	7,69%	15	7,32%	1,06	1

Fig. 12.- Genotipos de KIR de una población mestiza venezolana afectada con HAI tipo 1 y su comparación con individuos sanos. Los cuadros de color negro representan la presencia de los genes y los cuadros blancos la ausencia de los mismos. Se muestran los 4 genotipos encontrados con mayor frecuencia en la población estudiada (n= 52), estos se corresponden con el modelo reseñado por Yawata y col., 2002 (n=989).

2.- Tipificación de los alelos HLA-C.

La tipificación de HLA del tipo C en los individuos incluidos en el grupo de pacientes con HAI se realizó mediante hibridación con sondas específicas de Oligonucleótidos (PCR-SSO) usando el estuche comercial de Dynal Reli™ SSO HLA Typing Kit. En la figura 13 se muestran las tiras de nitrocelulosa usadas para el ensayo y el patrón de bandas revelado en cada una de ellas. Se utilizó una tira para cada paciente más un control positivo; compuesto por una muestra de ADN suministrada por el estuche comercial, y un control negativo, el cual no poseía ADN y no mostró ninguna banda lo que nos indica que no hubo ningún tipo de contaminación en el procedimiento. En la figura 13 B se muestra la plantilla utilizada para marcar qué bandas son positivas, lo cual se utilizó para la interpretación del patrón de hibridación mediante el programa informático Dynal AutoRELI 48.

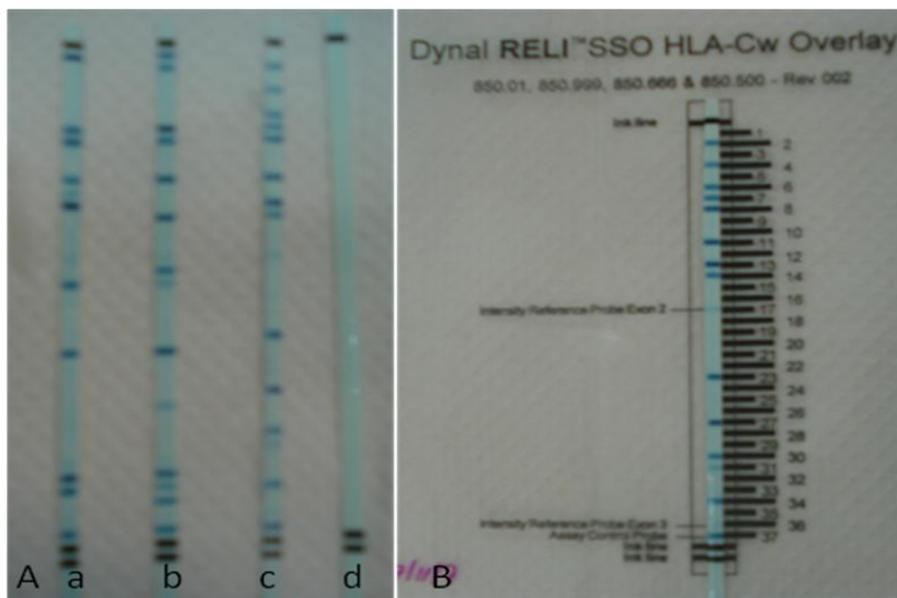


Fig.13.- Representación del sistema de tipificación de HLA- C. En la figura 13A se representa el patrón de bandas revelado en las tiras de nitrocelulosa. Se muestran resultados generados de HLA-C para el paciente 49 (a), 50 (b), control positivo de la reacción (c) y control negativo (d). Por otro lado, en la figura 13B se observa la plantilla mediante la cual se van detectando las bandas positivas para HLA- C.

Los resultados del tipaje de HLA-C obtenidos en este estudio más los reportados por Fortes y colaboradores, (2007) fueron divididos en dos grupos HLA C1 y C2 y posteriormente analizados en base a su condición homociga, (tabla 6) observándose mayor frecuencia en pacientes (HLA-C1C1=28,85%, HLA-C2C2=30,77%) que en individuos sanos (HLA-C1C1=27,4% HLA-C2C2=21,7%). Pero, en la combinación HLA- C1C2 las frecuencias fueron mayores en sanos (50,9%) que en individuos que padecen de HAI tipo 1 (40,38%). Ninguna diferencia significativa fue observada al realizar la prueba de Fisher.

Tabla 6 .- Frecuencia de los ligandos HLA en su forma homóciga (HLA C1C1 o HLA C2C2) en individuos con HAI tipo 1 y sanos.

	HAI n=52 (%)	Sanos n=106 (%)	OR	p	95% IC
HLA- C1C1	15 (28,85)	20 (27,4)	1,74	0,16	0,805-3,775
HLA- C2C2	16 (30,77)	23 (21,7)	1,604	0,241	0,759-3,391
HLA-C1C2	21 (40,38)	54 (50,9)	0,65	0,238	0,333- 1,278

F (%) = frecuencia
 HLA C1C1= dos alelos de HLA del grupo 1.
 HLA C2 C2= dos alelos de HLA del grupo 2.
 OR= Odds Ratio
 HLA C1 C2= un alelo de HLA-C del grupo 1 y otro alelo de HLA-C del grupo 2.

3.- Sistema KIR-HLA clase I.

Para este análisis se van a considerar los 34 pacientes tipificados por Fortes y Colaboradores para HLA-A, -B y -C más los 18 pacientes tipificados para HLA-C en este estudio, los cuales van a ser comparados con lo reportado en población sana. La importancia del estudio de los genes *KIR* en combinación con sus ligandos, radica en que de esta forma se analizan los genes *KIR* que son realmente funcionales. En las tablas 7, 8 y 9 se representan las frecuencias de los genes *KIR* en individuos con HAI tipo 1 en combinación con sus ligandos. En estas tablas se observó que todas las combinaciones *KIR* con sus ligandos HLA-A, B y C fueron más frecuentes en el grupo de individuos sanos que en los pacientes. Solo se observó mayor frecuencia de pacientes en la combinación 2DS2-HLA C1 (42,31 % de pacientes y 38,4 % de individuos sanos), y una frecuencia similar entre ambas poblaciones para 2DS1- HLA C2 (30,77 % de pacientes y 30,4 % de individuos sanos). HLA-C del grupo 2 con su unión a KIR 2DL1 (tabla 9) fue la que arrojó la mayor frecuencia en individuos que padecen de HAI tipo 1 (65,38%), así como un odds ratio de 0,76 sin embargo, no se observaron diferencias significativas

($p=0,476$). Por otro lado, la combinación KIR- HLA que menor frecuencia obtuvo en HAI tipo 1, fue 3DS1 HLA-Bw4 (8,82 %) (tabla 8), la cual arrojó valores de OR de 0,37 , pero al igual que 2DL1-HLA C2 , en este no se observó una asociación significativa ($p=0,14$). Las combinaciones que arrojaron una diferencia bastante significativa ($p<0,05$) fueron 2DL3 HLA C1 (OR= 0,40, $p=0,009$) (tabla 9) y 3DL1 HLA Bw4 (OR=0,31, $p=0,0109$) (tabla 8).

Tabla 7. Frecuencia de los genes KIR y la unión a sus ligandos HLA-A.

KIR+ HLA-A	HAI n(%)	Sanos n(%)	OR	p	95% IC
3DL2- HLA-A3/11	4 (11,76)	35 (21,1)	0,499	0,245	0,1648-1,51

HAI= 34 individuos. Sanos= 166 individuos. F (%) = frecuencia.
 OR= Odds Ratio. IC= Intervalo de confianza. HLA – A3/11= alelos de HLA-A.

Tabla 8. Frecuencia de los genes KIR y la unión a sus ligandos HLA-B.

KIR+ HLA-B	HAI n (%)	Sanos n (%)	OR	p	95% IC
3DL1- HLA Bw4	6 (17,65)	62 (40,79)	0,31	0,0109	0,1216-0,796
3DS1-HLA Bw4	3 (8,82)	31 (20,4)	0,37	0,14	0,108-1,32

HAI= 34 individuos. Sanos= 152 individuos. F (%) = frecuencia.
 OR= Odds Ratio. IC= Intervalo de confianza. HLA Bw4= alelos de HLA- B que poseen un motivo Bw4 definido serológicamente.

Tabla 9. Frecuencia de los genes KIR y sus ligandos HLA-C.

KIR+ HLA-C	HAI n(%)	Sanos n (%)	OR	P	95% IC
2DL1- HLA C2	34 (65,38)	89 (71,2)	0,76	0,476	0,3831-1,524
2DL2- HLA C1	18 (34,62)	49 (39,2)	0,821	0,612	0,4181-1,61
2DL3 -HLA C1	27 (51,92)	91(72,8)	0,40	0,0089	0,2061-0,79
2DS1- HLA C2	16 (30,77)	38 (30,4)	1,018	1,000	0,50-2,052
2DS2-HLA C1	22 (42,31)	48(38,4)	1,18	0,736	0,609-2,271
2DS4- HLA- Cw4	9 (17,31)	30 (24)	0,663	0,43	0,29-1,52

HAI= 52 individuos.

Sanos= 125 individuos.

F (%) = frecuencia.

OR= Odds Ratio.

IC= Intervalo de confianza. HLA C1= alelos de HLA del grupo 1.

HLA C2 = alelos de HLA del grupo 2.

Posteriormente se procedió a estudiar los genes *KIR* en combinación con su ligando en condición homociga (tabla 10). Se observó que en forma general (menos en 2DS1 HLA C2C2 que ocurre lo contrario) estas combinaciones son más frecuentes en individuos que padecen de HA tipo1 que en aquellos sanos. Este estudio, generó valores de OR cercanos a 1 sin diferencias significativas, lo que no nos indica si la presencia de estas combinaciones son capaces de conferir protección o susceptibilidad a HAI tipo 1 a los individuos que posean dichos genes.

Tabla 10.- Frecuencia de los ligandos HLA en su forma homóciga (HLA C1C1 o HLA C2C2) en combinación con los genes KIR.

	HAI n (%)	Sanos n (%)	OR	P	95% IC
2DL1 HLA- C2C2	14 (26,95)	23 (20,1)	1,394	0,426	0,6478-2,99
2DL2 HLA- C1C1	8 (15,38)	15 (13,6)	1,152	0,8112	0,4544-2,918
2DL3 HLA- C1C1	13 (25)	27 (24,5)	1,025	1,000	0,477-2,199
2DS1 HLA- C2C2	4 (7,69)	10 (9,09)	0,833	1,000	0,2485-2,794
2DS2 HLA-C2C2	11 (21,15)	15 (13,6)	1,699	0,254	0,7189-4,016

HAI=52 individuos. Sanos= 110 individuos. F (%) = frecuencia OR= Odds Ratio . HLA C1C1= dos alelos de HLA del grupo 1.HLA C2 C2= dos alelos de HLA del grupo 2. HLA C1 C2= un alelo de HLA-C del grupo 1 y otro alelo de HLA-C del grupo 2.

Por último comparamos los individuos homócigos para ambas condiciones (genes *KIR* y ligandos HLA) (tabla 11), observando que 2DL2/2DL2 unido con su ligando HLA-C1C1 fue más frecuente en individuos que padecen de HAI tipo 1 (11,54%), que en población sana (1,82 %), lo cual produjo un OR de 7,043 con una *p* significativa. Este valor de OR indica que individuos que presenten esta combinación pueden ser más susceptibles a la enfermedad en estudio que los que no la posean. En contraste 2DL3/2DL3 HLA-C1C1 y 2DL2/2DL3 con la unión a su ligando HLA-C1C1 se observaron en mayor proporción en individuos sanos (12,73% y 14,55% respectivamente) que en población enferma (11,54% y 7,69% respectivamente) sin embargo no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 11 . Frecuencia de los ligandos HLA C1C1 en combinación con los genes KIR en su condición homóciga.

	HAI n (%)	Sanos n (%)	OR	p	95% IC
2DL2/2DL2 HLA-C1C1	6 (11,54)	2 (1,82)	7,043	0,0139	1,370-36,219
2DL3/2DL3 HLA-C1C1	6 (11,54)	14 (12,73)	0,894	1,000	0,3228-2,478
2DL2/2DL3 HLA- C1C1	4 (7,69)	16 (14,55)	0,489	0,307	0,1551-1,54

HAI= 52 individuos. Sanos= 110 individuos. F (%) = frecuencia.
 2DL2/2DL2 HLA C1C1= dos alelos del gen 2DL2 y dos alelos de HLA C del grupo 1.
 2DL3/2DL3 HLA C2 C2= dos alelos del gen 2DL3 y dos alelos de HLA C del grupo 2.
 OR= Odds Ratio. 2DL2/2DL3 HLA C1 C1= un alelo del gen 2DL2 y uno de 2DL3, así como dos alelos de HLA-C del grupo 1.

En la figura 14 se muestra la presencia o ausencia de 3 genes inhibidores (*2DL1*, *2DL2* y *2DL3*) y dos activadores (*2DS1* y *2DS2*) en combinación con sus ligandos (HLA C1C1, HLA C2C2 o HLA C1C2). El genotipo más frecuente se observó en el 13,5% de los pacientes con HAI tipo 1 y sólo en el 3,9 % de los individuos sanos. La segunda combinación mas frecuente se encontró en el 9,6 % de los pacientes y en el 4,8 % de los individuos sanos con la presencia de los genes *2DL1*, *2DL3*, *2DS1* y HLA C1C2. El siguiente genotipo difiere del anterior por la ausencia del gen *2DS1* y se observó en el 7,77 % de los pacientes y en el 10,7 % de los individuos sanos. Además se observa la presencia de solo *2DL1* y *2DL3*, pero con el ligando HLA C1C1, lo que indica que sólo es funcional *2DL3* con su ligando. También observamos en el 5,88% de los pacientes y en el 7,8% de la población sana, la presencia de los 5 genes con el ligando HLA C1C2 y la misma combinación de genes pero con el ligando HLA C2C2 se encontró en el mismo porcentaje de pacientes que la anterior, pero solo estuvo presente en el 3,9 % de la población sana. Una combinación con la presencia de todos los genes menos el *2DS1* y el ligando HLA C1C2 (5,8% en pacientes y 7,3 en población sana) fue

observada, sin embargo esta combinación con la presencia del ligando HLA C2C2 se observa en el 5,8% de pacientes y solo en el 2,4% de los individuos sanos.

Genotipo									HAI n=52 (%)	Sanos n=205 (%)
2DL			2DS		HLA					
1	2	3	1	2	C1C1	C2C2	C1C2			
									7 (13,5)	8 (3,9)
									5 (9,6)	10 (4,8)
									4 (7,77)	22 (10,7)
									3 (5,8)	16 (7,8)
									3 (5,8)	15 (7,3)
									3 (5,8)	9 (4,4)
									3 (5,8)	5 (2,4)
									3 (5,8)	8 (3,9)

Fig.14.- Presencia o ausencia de la combinación de KIR2D con sus ligandos HLA-C. Los cuadros de color negro representan la presencia de los genes y los cuadros blancos la ausencia de los mismos. Se muestran los 8 genotipos encontrados con mayor frecuencia en la población con HAI tipo 1 (n= 52), estos se corresponden con el modelo reseñado por Shastry y col., 2008 en diabetes mellitus tipo 1 (n=98).

Discusión

Las células NK son importantes reguladores de la respuesta inmune, su interacción con células dendríticas y macrófagos pueden regular su actividad mediante la producción de citocinas y estimulación de la respuesta TH-1 (Sumati y Long., 2005). La citotoxicidad de estas células, está relacionada con la disminución de los niveles de expresión de MCH-I en las células blanco. Cabe destacar, que la activación de las células NK, ocurre cuando las señales activadoras dominan sobre las inhibitoras, donde el balance de la expresión de MHC- I en las células blanco determinan la susceptibilidad del ataque de las células NK (Hyun-Bae y Sarvetnick, 2004). La dominancia de estas señales activadoras, puede beneficiar el progreso de infecciones virales y transformaciones malignas, ya que ataca a la célula blanco; pero pueden ser perjudiciales para transformaciones neoplásicas y autoinmunidad debido a que en este caso ataca a células propias (Sumati y Long., 2005). Por ello nos propusimos estudiar la presencia o ausencia de los genes KIR y la combinación con sus respectivos ligandos, con la finalidad de observar una posible asociación con la susceptibilidad a HAI tipo 1, debido a que hasta el momento no se han reportado otros estudios referentes a este tema en esta patología.

En nuestro estudio observamos que todos los genes KIR se encuentran presentes en la población. El número de genes KIR activadores por genotipo puede influenciar la susceptibilidad de las enfermedades autoinmunes; por ello realizamos un análisis de las frecuencias de los genes KIR inhibidores y activadores observando que los genes KIR inhibidores son encontrados con mayor frecuencia que los activadores, tanto en población sana como enferma. Sin embargo, cuando

se analizó el número de genes KIR en cada población, un incremento en la presencia de más de dos genes activadores fue observado en población con HAI con respecto a la sana, lo cual no produjo una p significativa. Este resultado se corresponde con lo reportado por Van der Slik y col. (2003) en Diabetes Mellitus tipo 1, e indica que un mayor porcentaje de genes activadores induciría la activación de las células NK, lo cual atacaría células propias de individuos con HAI y por ende conferiría susceptibilidad en ellos. Por el contrario, se observó que menos de dos genes es más frecuente en población sana que pacientes.

Por otra parte, estudiamos la frecuencia de cada gen *KIR* encontrando que la presencia de genes *2DL1*, *2DL3* y *2DP1* puede conferir protección a individuos sanos de padecer HAI tipo 1, sin embargo no se encontró ninguna asociación significativa que causara susceptibilidad a la enfermedad. En individuos mestizos venezolanos con Hepatitis autoinmune tipo 1, encontramos que el gen *KIR 2DS2* (OR=1,5) fue más frecuente en pacientes que en controles, al igual que lo encontrado por Pellet y colaboradores (2207) en pacientes con Lupus Eritromatoso sistémico, sin embargo estas diferencias no tuvieron significancia. Varios estudios realizados en enfermedades autoinmunes, reportan susceptibilidad a esas enfermedades por la presencia de diversos genes KIR. Así Liene Nikitina-Zake y col. (2004), observaron que genes como *2DL2* y *2DS2* son factores altamente riesgosos en diabetes mellitus tipo 1. Además Momot y colaboradores, reportaron que la presencia de *2DS2* en ausencia de *2DL2* confiere susceptibilidad a escleroderma pero no a lupus. Por último, Shastry y col. (2008) reportan que genes KIR como *2DL2*, *2DL5*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3* y *3DS1* están positivamente asociados con la susceptibilidad a Diabetes Mellitus tipo 1.

Al analizar los genes *KIR 2DL2* y *2DL3* en su forma homóciga observamos que están presentes en mayor frecuencia en pacientes que en controles, pero sólo *2DL2* arrojó una diferencia significativa (OR=2,85, p=0,0276), lo cual podría indicar que esta combinación inhibe la actividad citotóxica de la célula NK de una forma débil.

La Hepatitis Autoinmune tipo 1 se encuentra en su mayoría en mujeres (Djilali y col., 2006), sin embargo puede ocurrir a cualquier edad a diferencia de Hepatitis Autoinmune tipo 2, que suele presentarse en su mayoría en niños y adolescentes. Aunque nuestro tipo de patología no se encuentra asociado a la edad de igual forma analizamos la frecuencia de los genes KIR en población menor y mayor de 18 años y del sexo masculino o femenino. Además cabe destacar, que no incluimos como patrón de inclusión la edad y sexo de nuestros pacientes debido a la dificultad de encontrar individuos que cumplan con todos los parámetros de inclusión mencionados. En los resultados encontramos que genes como *2DL1* (OR=0,22), *2DL3* (OR=0,23) y *2DP1*(OR=0,22) pueden conferir protección en individuos mayores de 18 años. Cabe destacar que estos genes son los mismos que reportaron diferencias significativas en el análisis elaborado sin la restricción de edad. Por otro lado, cuando comparamos entre individuos mayores y menores de 18 años no encontramos diferencias significativas, debido a que como se ha reportado por Djilali y col., (2006) este tipo de Hepatitis Autoinmune puede ocurrir a cualquier edad. Sin embargo, Shastry y col. (2008) reporta que Diabetes tipo 1 se encuentra asociada con la edad y el sexo de la población a estudiar, lo que es de vital importancia a la hora de elegir los pacientes y controles y poder llegar a una conclusión certera. El número total del grupo de pacientes estudiados por nosotros fue de 52, de los cuales 46 son mujeres y solo 6 son hombres, este

porcentaje encontrado puede ser explicado debido a que el sexo femenino es más susceptible a padecer HAI (Djilali y col. 2006). Por ello, comparamos las frecuencias de distribución de los genes KIR entre ambos sexos, sin embargo con un número de pacientes masculinos tan pequeño (n=6) no genera gran variabilidad genética que requiera un análisis estadístico. Pero se comparó la población femenina y masculina entre individuos sanos, lo cual no generó diferencias significativas. Además comparamos las frecuencias de los genes KIR entre individuos masculinos padecientes de HAI y sanos, y no observamos diferencias significativas, en cambio cuando analizamos los grupos femeninos encontramos diferencias significativas sólo en el gen *2DL1*, lo que podría indicar que la frecuencia de distribución de los genes *KIR* en el sexo femenino es un factor implicado en la susceptibilidad a HAI tipo 1.

El análisis de la herencia y estructura genómica de los genes KIR es complejo dado que se segregan en haplotipos conformados por presencia o ausencia de genes, que codifican para moléculas con propiedades inhibitoras o activadoras de la función de la célula NK. Como consecuencia, existe una probabilidad baja que dos individuos no relacionados genéticamente, seleccionados al azar, tengan el mismo genotipo de receptores KIR (Torres-García, 2008). Uhrberg y col. en 1997 definieron dos haplotipos básicos de los genes KIR basados en el contenido de sus genes. En población mestiza venezolana de tercera generación con diagnóstico de HAI tipo 1, el genotipo 1 fue el más frecuente y posee la presencia de 7 genes, de los cuales 6 son inhibidores y 1 solo es activador, lo cual coincide con el haplotipo A básico definido por Uhrberg y col. (1997). Además este genotipo concuerda con el reportado como más frecuente en la data recopilada por Yawata y col. en población caucásica, africanos y

asiáticos del este y del oeste y por el estudio de Conesa y col. en población sana venezolana. Los otros genotipos más frecuentes (figura 4), presentan un incremento de los genes activadores (2 o más).

Con la finalidad de observar si había una asociación significativa entre los factores en estudio, procedimos a realizar un análisis de OR y una prueba de Fisher. Los valores observados de OR en los genotipos más frecuentes, fueron menores a 1 lo que podría indicarnos que estos genotipos podrían conferir protección a HAI tipo 1, sin embargo las diferencias no fueron significativas (figura 12). Además se observaron genotipos presentes solo en individuos con la patología como el genotipo 14, que presenta todos los genes *KIR* menos el *2DL3* y el genotipo 90, que consta de 4 genes activadores y 7 inhibidores (ausencia de *2DL2*, *2DS3* y *2DS4*) ambos reportados por Yawata y col. (2002) (figura 11). Por otra parte, encontramos un genotipo que no ha sido reportado en ningún estudio relacionado, el cual está conformado por la presencia de todos los genes menos *2DL2*, *2DS4* y *2DS5*.

Posteriormente analizamos los ligando HLA C del grupo 1 y del grupo 2, donde observamos que HLA C1C1 se encuentra presente con mayor frecuencia en individuos con HAI que en sanos, lo cual corresponde por lo reportado por Shastry col. (2008), pero a diferencia de este autor nosotros no conseguimos diferencias significativas cuando analizamos HLA C2C2 y HLA C1C2.

La razón de la diversidad de receptores KIR y la contribución de KIRs individuales para la activación de las células NK y células T, no está completamente descubierto aún, pero su importancia ha sido bastante resaltada en

muchos estudios genéticos (Sumati y Long, 2005). Así, algunos autores han propuesto modelos de combinaciones específicas KIR-HLA que determinan señales activadoras o inhibitoras de las células NK, lo que afecta la susceptibilidad y resistencia a numerosas enfermedades o modifican el curso clínico de ciertas patologías (Torres-García y col., 2008, Khakoo y col., 2006).

Posteriormente, cuando analizamos los genes KIR y la combinación con sus ligandos, ambos en condición homociga, conseguimos diferencias significativas en la combinación 2DL2/2DL2 con su ligando HLA- C1C1, que al realizarle las pruebas estadísticas mostró un valor de OR de 7,06, lo cual también fue reportado como factor de riesgo a Diabetes Mellitus tipo 1 por Shastry y col. (2008) con esta misma combinación pero sin homocigocis para ambos alelos. Cabe destacar que el gen 2DL2 en su condición homociga también fue encontrado que podría conferir susceptibilidad. Esto puede ser explicado según lo reportado por Kulkarni y colaboradores (2008), debido a que estos investigadores reportan que 2DL3 en combinación con su ligando, posee una inhibición más débil que 2DL2 con su ligando y esta es más débil aún que 2DL1 con HLA-C2, lo cual podría provocar que la inhibición sea perturbada, dominando una señal de activación de la actividad citotóxica de las células NK, lo cual atacaría células propias del individuo confiriéndoles susceptibilidad. Sin embargo se recomienda, aunque conocemos el grado de dificultad, aumentar el número de pacientes con HAI tipo 1 para observar si la susceptibilidad reseñada es sostenida, ya que muy poco individuos fueron positivos para esta condición.

Además en el estudio realizado, observamos que 2DS2 en combinación con su ligando se encuentran en mayor proporción en individuos con HAI que en sanos,

lo cual concuerda con lo reportado por Van der Slik y col., (2008) en población con Diabetes tipo 1, sin embargo nosotros no encontramos diferencias significativas. Por otro lado, algunos autores señalan que la presencia de KIR2DS1 y/o KIR2DS2 en combinación con su ligando HLA-C en forma homocigota favorece la susceptibilidad a artritis psoriática (Nelson y col., 2004). Por otra parte, la combinación KIR2DS1 con su ligando no produjo diferencias significativas, sin embargo este receptor en combinación con HLA-Cw*06 es un factor de riesgo para el desarrollo de psoriasis vulgar (Torres-García y col., 2008). Cabe destacar, que encontramos diferencias significativas en alelos como 3DL1 con su ligando HLA-Bw4 y 2DL3 con su ligando HLA C1, ambos encontrados en mayor frecuencia en individuos sanos que en pacientes. En estas combinaciones el análisis estadístico arrojó valores de OR menores de 0,5 (3DL1 HLA-Bw4 OR=0,31 y 3DL1 HLA-C1 OR=0,40). Este resultado podría indicar que la ausencia de alguna de estas combinaciones podría conferir susceptibilidad a individuos sanos a que padezcan de HAI tipo1, esto debido a que estos receptores inhibidores no activarían las células NK y por ende no atacarían células propias. Cabe destacar que estas combinaciones no habían sido reportadas en ningún estudio en otras enfermedades autoinmunes, y que este es la primera investigación que se realiza en HAI tipo con respecto a este tema.

El análisis de nuestra población en base a diferentes combinaciones de genes KIR2D activadores e inhibidores, con o sin sus ligandos HLA-C correspondientes, se propuso con la finalidad de explicar el efecto de la variación genética en el locus KIR en combinación su ligando HLA que pudiera conferir susceptibilidad a la enfermedad. Así observamos que una combinación con la presencia de *2DL1*, *2DL3*, *2DS1* y HLA C1C2 fue más frecuente en pacientes que

en individuos sanos, lo que pudiera estar confiriendo susceptibilidad a esta enfermedad. En cambio, cuando la combinación estaba conformada por los mismos genes de la anterior, pero ahora sin el gen activador *2DS1*, se observó en mayor proporción en individuos sanos que en pacientes, lo que podría estar confiriendo protección a individuos que padecen de HAI tipo 1. Por otro lado combinaciones con la presencia de los 3 genes inhibidores (*2DL1*, *2DL2* y *2DL3*) y dos activadores (*2DS1* y *2DS2*) con el ligando HLA C1C2 son más frecuentes en individuos sanos, esto debido a que estarían dominando las señales inhibitoras sobre las activadoras, pudiendo evitar la activación de las células NK (figura 14).

En síntesis en nuestro estudio la combinación *2DL2* con su ligando HLA, ambos en condición homociga, es una posible asociación que confiere susceptibilidad a HAI tipo 1. En cambio, las combinaciones *3DL1* y *2DL3* con sus respectivos ligandos actúan inhibiendo la activación de las células NK y por ende, son genes protectores. En este estudio hay un dominio de las combinaciones inhibitoras sobre las activadoras, lo que podría ser un factor protector en individuos a que padezcan HAI tipo 1.

Conclusiones

❖ Los genes KIR inhibidores son más frecuentes que los activadores tanto en población sana como en individuos con HAI tipo 1.

❖ Más de dos genes KIR activadores fueron observados con mayor frecuencia en pacientes con HAI tipo 1 que en individuos sanos, pero no se encontró asociación significativa de ningún gen KIR activador con la susceptibilidad a HAI tipo 1.

❖ Los genes *KIR 2DL1* y *2DL3*, podrían conferir menos susceptibilidad al desarrollo de Hepatitis autoinmune tipo 1 en población mestiza venezolana de tercera generación, sin embargo no se encontró ningún gen KIR que podría causar susceptibilidad a esta patología.

❖ El genotipo más frecuente encontrado en población mestiza venezolana con HAI tipo 1 concuerda con el reportado como más frecuente en población sana venezolana y corresponde con el haplotipo A básico.

❖ Un posible nuevo genotipo fue encontrado en el 1,92 % de pacientes. En este genotipo estaban presentes 7 genes KIR inhibidores (menos *2DL2*) y 4 genes KIR activadores (menos *2DS4* y *2DS5*).

❖ Las combinaciones *3DL1* HLA-Bw4 y *2DL3* HLA-C1 menos susceptibilidad al padecimiento de HAI tipo 1 en individuos mestizos venezolanos, en cambio *2DL2* en combinación con su ligando en condición homóciga pudiera conferir susceptibilidad a esta patología.

Bibliografía

Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. 2002. *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana. Cuarta edición. Madrid, España.

Bashirova, A., Martin, M., McVicar, D., Carrington, M. 2006. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense. *Annu Rev Genom Hum G.* **7**:277-300.

Boyton, R., Altmann, D. 2007. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol.* **149**:1-8.

Cassinotti, A., Birindelli, S., Clerici, M., Trabattoni, D., Lazzaroni, M., Ardizzone, S., Colombo, R., y colaboradores. 2009. HLA and Autoimmune Digestive Disease: A Clinically Oriented Review for Gastroenterologists. *Am J Gastroenterol.* **104**: 195-217.

Chen, A., Liu, Q., Cui, X., Cui, M., Yan, W., Xie, S., Zhu, N. y colaboradores. 2008. Study on the polymorphism of killer cell immunoglobulin like receptor (KIR) gene with systemic lupus erythematosus of North population in China. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* **8**:811-813.

Conesa, A., Fernández-Mestre, M., Padrón, D., Toro, F., Silva, N., Tassinari P., Blanca. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the mestizo population from Venezuela. *En prensa*.

Corado, J., Mora de Orta, S. 2000. *Inmunología Actual: Bases fisiológicas para la Comprensión de las alteraciones del sistema inmunitario*. Alfa impresiones. Primera edición. Valencia, Venezuela.

Czaja, A., Strettell, M., Thomson, L., Santrach, P., Moore, S., Donaldson, P. 1997. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology.* **25**:317–323.

Djilali-Saiah, I., Fakhfakh, A., Louafi, A., Caillat-Zucman, S., Debray, D., Alvarez, F., 2006. HLA Class II influences humoral autoimmunity in patients with type 2 autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* **45**:844–850.

Duarte-Rey, C., Pardo, A., Rodríguez-Velosa, Y., Mantilla, R., Anaya, J., Rojas-Villarraga, A. 2009. HLA class II association with autoimmune hepatitis in Latin America: A meta-analysis. *Autoimmun Rev.* **4**: 325-331.

Du, Z., Gjertson & Elaine, D. 2007. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell. *Immunogenet.* **59**: 1-15.

Farag,S., Caligiuri,M. 2006. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* **20**:123-137.

Fortes,MP., Machado,I. , Gil,G., Fernandez-Mestre,M., Dagher,L.,Leo, R. 2007.Genetic contribution of major histocompatibility complex class II region to type 1 autoimmune hepatitis susceptibility in Venezuela. *Liver Int.* **27**:1409–1416.

Goldberg,A. ,Bittencourt,P., Oliveira,L., Ramasawmy,R., Marin,M., Palacios,S., Kalil,J. y colaboradores.2007. Autoimmune Hepatitis in Brazil: An Overview. *Scand J Immunol .* **66**: 208–216.

Gomez- Lozano, N., Vilches, C. 2002. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin- like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: An update. *Tissue Antigens.* **59**: 184-193.

Hsu, K., Liu, X., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R., Dupont, B. 2002. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol.* **169**: 5118-5129.

Hyun-Bae, J., Sarvetnick, N. 2004. The Role of NK cell receptors in Autoimmune disease. *Autoimmunity.* **37**: 147-153.

Kessler,W. , Cummings, O., Eckert, G., Chalasani,N. , Lumeng, L., Kwo, P.2004. Fulminant hepatic failure as the initial presentation of acute autoimmune hepatitis.*Clin Gastroenterol H.* **7**: 625-631.

Khakoo, S., Thio, C., Martin, M., Brooks, C., Gao, X. Astemborski, J., Cheng, J. Y colaboradores. 2004. HLA and NK cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection. *Science.* **305**: 872-874.

Khakoo, S., Carrington, M. 2006. *Inmunol Rev.* **214**:186-201.

Kulkarni, S., Martin, M., Carrington, M. 2008. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol.* **20**:343-352.

Lahita, R., Bradlow, H., Ginzler, E. 1987. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **30**: 241-248.

Lewis, L. 2005. Nk cell recognition. *Annu Rev Immunol.***23**:225–274.

Liene, N., Rajalingham, R. Rumba, I. 2004. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Latvian patients with type 1 diabetes mellitus and healthy controls. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **1037**: 161.

Luque, J., Herráez, A. 2000. *Biología Molecular e Ingeniería Genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Harcourt, Primera Edición, Madrid, España.

[Martin, MP.](#), [Gao, X.](#), [Lee, J.](#), [Nelson, G.](#), [Detels, R.](#), [Goedert, J.](#), [Buchbinder, S.](#) y colaboradores. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* **31**: 429-434.

Momot, T., Schmidt, R., Witte, T. 2006. Regulation of Killer Immunoglobulin-like Receptors in Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol.* **33**:1029.

Muratori, P., Czaja, A., Muratori, L., Pappas, G., Maccariello, S., Cassani, F., Granito, A. y colaboradores. 2005. Genetic distinctions between autoimmune hepatitis in Italy and North America. *World J Gastroenterol.* **11**: 1862-1866.

Nelson, G., Martin, M., Gladman, D., Wade, J., Trowsdale, J., Carrington, M. 2004. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/ susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol.* **173**:4273-4276.

Pando, M., Larriba, J., Fernandez, G.C., Fainboim, H., Ciocca, M., Ramonet, M., Badia, I. y colaboradores. 1999. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology.* **30**:1374-1380.

Pellett, F., Siannis, F., Vukin, I., Lee, P., Urowitz, M., Gladman, D. 2007. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. *Tissue Antigens.* **69** :106-108.

Peters, M. 2002. Animal models of autoimmune liver disease. *Immunology and Cell Biology.* **80**:113–116.

Rudnick, C., Franceschi, D., Marangon, A., Guelsin, G., Sell, A., Visentainer, J. 2008. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol.* **69**: 872-876.

Santin, I., de Nanclares, G., Calvo, B., Gaafar, A., Castaño, L. 2006. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in the Basque population: association study of KIR gene contents with type 1 diabetes mellitus. *Hum Immunol.* **67**:118-124.

Shastri, A., Sedimbi, S., Rajalingam,R., Nikitina-Zake, L., Rumba, I., Wigzell, H., Sanjeevi, C.2008. Combination of KIR 2DL2 and HLA-C1 (Asn 80) confers susceptibility to type 1 diabetes in Latvians. *Int J Immunogenet.* **35**:439-446.

Seki,T., Kiyosawa, K., Inoko, H., Ota, M.1990. Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. *Hepatology.* **12**:1300-1304.

Soza, A. 2007. Hepatitis autoimmune. *Gastr Latinoam.* **18**: 193-197.

Sumati, R., Long, E. 2005. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med.* **7**:1025-1029.

Teufel,A., Wörns,M., Weinmann,A., Centner,C., Piendl,A., Lohse,A., Galle, P. y colaboradores. 2006. Genetic association of autoimmune hepatitis and human leucocyte antigen in German patients. *World J Gastroenterol* .**34**: 5513-5516.

Torres-Garcia, D., Barquera, R., Zúñiga, J. 2008. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Rev inst nal enf resp mex.* **1**: 57-65.

Ulrberg, M., Valiente, N., Young, N., Lanier, L., Phillips, J. 2001. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in Tcells. *Immunology.* **166**: 3923-3926.

Vasquez- García,M., Aláez,C., Olivo,A.1998.MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* **28**:985-990.

Van der Slik,A., Koeleman,B., Verduijn,W., Bruining,G., Roep,B. , Giphart,M. 2003. KIR in Type 1 Diabetes: Disparate Distribution of Activating and Inhibitory Natural Killer Cell Receptors in Patients Versus HLA-Matched Control Subjects. *Diabetes.* **52**:2639-2642.

Vergani, D., Mieli-Vergani, G. 2004. Mechanisms of autoimmune hepatitis. *Pediatr Transplant* . **8**: 589–593.

Williams,A., Bateman,A., Khakoo, S. 2005. Hanging in the balance: KIR and their role in disease. *Mol Interv.* **4**:226-237.

Yawata, M., Yawata, N., Abi-Rached, L., Parham, P. 2002. Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Critical reviews in Immunology.* **22**: 462-482.

Anexos.

Anexo 1. Tabla 12. Criterios para el diagnóstico de hepatitis autoinmune1.

Categoría	Factor	Score
Sexo	Femenino	+2
Relación FAL/GOT (o GPT)	>3	-2
	<1,5	+2
Gammaglobulina o IgG (veces sobre el límite superior normal)	>2,0	+3
	1,5-2,0	+2
	1,0-1,5	+1
	<1,0	0
Títulos de ANA, SMA, o anti-LKM1	>1:80	+3
	1:80	+2
	1:40	+1
	<1:40	0
AMA	Positivo	-4
Marcadores virales de infección activa	Positivo	-3
	Negativo	+3
Drogas hepatotóxicas	Si	-4
	No	+1
Alcohol	<25 g/d	+2
	>60 g/d	-2
Enfermedad autoinmune concurrente	Cualquier enfermedad no-hepática de origen inmune	+2
Otros autoanticuerpos	Anti-SLA/LP, actina, LCI, pANCA	+2
Características histológicas	Interfase de hepatitis	+3
	Células plasmáticas	+1
	Rosetas	+1
	Ninguna de las de arriba	-5
	Cambios biliares	-3
	Características atípicas	-3
HLA	DR3 o DR4	+1
Respuesta al tratamiento	Remisión completa	+2
	Remisión con recaída	+3
Score pretratamiento		
Diagnóstico definitivo		>15
Diagnóstico probable		10-15
Score posttratamiento		
Diagnóstico definitivo		>17
Diagnóstico probable		12-17

Anexo 2. Consentimiento Informado.

Por la presente hago constar que mi médico tratante Dr (a)_____ me propuso ser incluido (a) para el estudio, en una muestra de sangre, de marcadores genéticos asociados con Hepatitis Autoinmune tipo 1 por lo que acepto trasladarme al Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela para participar en dicho estudio.

Paciente/Representante

Anexo 3. Tabla 13. Distribución de la frecuencia de genes KIR por grupo de edades.

Genes KIR	≤ 18 a n (%)	f	≥ 18 a n (%)	f	OR	p	95% IC
2DL1	16 (94,1)	0,76	30 (88,2)	0,66	2,13	0,6	0.2194- 20.739
2DL2	7 (41,2)	0,23	18 (52,9)	0,31	0,62	0,55	0.1916- 2.020
2DL3	16 (94,1)	0,76	26(76,5)	0,51	4,9	0,24	0.5617 -43.147
2DL5	10 (58,8)	0,36	17(50,00)	0,29	1,4	0,766	0.4402 - 4.636
3DL1	15(88,2)	0,66	34(100)	1	0,089	0,1067	0.004065-1.986
2DS1	7 (41,2)	0,23	13 (38,2)	0,21	1,13	1,00	0.3446 -3.711
2DS2	9 (52,9)	0,31	22 (64,7)	0,41	0,61	0,54	0.1878-2.005
2DS3	3 (17,6)	0,09	10 (29,4)	0,16	0,51	0,50	0.1207 - 2.191
2DS4	15 (88,2)	0,66	31 (91,2)	0,70	0,72	1,00	0.1093 - 4.818
2DS5	7 (41,2)	0,23	11(32,4)	0,18	1,46	0,55	0.4390- 4.879
3DS1	8(47,1)	0,27	14 (41,20)	0,23	1,27	0,76	0.3932 -4.101
2DP1	15(88,2)	0,66	30 (88,2)	0,66	1	1,00	0.1641 - 6.095

≤ 18 años = 17 individuos. ≥ 18 años= 34 individuos. F (%) = frecuencia .
f= frecuencia génica. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.

Anexo 4. Tabla 14. Tabla comparativa de la frecuencia de genes KIR en el grupo de individuos mayores de 18 años.

GenesKIR	HAI tipo 1 n (%)	f	Sanos n (%)	f	OR	p	95% IC
2DL1	30 (88,2)	0,66	199 (97,1)	0,83	0,22	0,03	0.06026- 0.8486
2DL2	18 (52,9)	0,31	101 (49,27)	0,29	1,15	0,715	0.5598 - 2.397
2DL3	26(76,5)	0,51	191 (93,17)	0,74	0,23	0,005	0.09115-0.6226
2DL5	17(50,00)	0,29	123 (60,00)	0,37	0,66	0,34	0.3219 -1.381
3DL1	34(100)	1	185 (90,24)	0,69	7,6	0,08	0.4502- 129.16
2DS1	13 (38,2)	0,21	88 (42,93)	0,24	0,82	0,708	0.3907 - 1.734
2DS2	22 (64,7)	0,41	102 (49,76)	0,29	1,85	0,137	0.8702 - 3.939
2DS3	10 (29,4)	0,16	43 (20,98)	0,11	1,5	0,27	0.6977- 3.532
2DS4	31 (91,2)	0,70	184 (89,76)	0,68	1,17	1,00	0.3317 -4.193
2DS5	11(32,4)	0,18	84 (40,98)	0,23	0.69	0,449	0.3187 -1.489
3DS1	14 (41,20)	0,23	90 (43,90)	0,25	0,89	0,85	0.4281- 1.869
2DP1	30 (88,2)	0,66	199 (97,07)	0,83	0,22	0,0386	0.06026 -0.8486

HAI= 34 individuos.

Sanos= 205.

F (%) = frecuencia .

f= frecuencia génica.

OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.

Anexo 5. Tabla 15. Distribución de la frecuencia de genes KIR en individuos sanos por sexo.

Genes KIR	Masculino n (%)	Femenino n (%)	OR	p	IC
2DL1	57 (98,3)	41 (100)	0,46	1	0.01834 - 11.631
2DL2	30 (51,7)	20(48,8)	1,1	0,83	0.5053 - 2.505
2DL3	55(94,8)	38(92,7)	1,44	0,68	0.2771 - 7.561
2DL5	36 (62,1)	26(66,40)	0,94	1	0.4125 - 2.161
3DL1	51(87,9)	39(95,1)	0,37	0,29	0.07348 - 1.90
2DS1	26 (44,8)	21 (51,2)	0,77	0,54	0.3470 - 1.725
2DS2	30 (51,7)	21 (51,2)	1,02	1	0.4583 - 2.272
2DS3	18 (31)	11 (26,8)	1,22	0,82	0.5054 - 2.980
2DS4	50 (86,2)	39 (95,1)	0,32	0,18	0.06436 - 1.596
2DS5	18 (31)	20(48,8)	0,47	0,1	0.2065 - 1.081
3DS1	23 (39,7)	20(48,8)	0,69	0,41	0.3077 - 1.547

Masculinos = 58 individuos. Femeninos =41 individuos. F (%) = frecuencia f= frecuencia génica OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.

Anexo 6. Tabla 16. Distribución de la frecuencia de genes KIR por sexo en población mestiza venezolana con padecimiento de Hepatitis Autoinmune tipo 1.

Genes KIR	Masculino n (%)	f	Femenino n(%)	f
2DL1	6 (100)	1	41 (89,1)	0,67
2DL2	2 (33,3)	0,2	22(47,8)	0,28
2DL3	6 (100)	1	37(80,4)	0,56
2DL5	3(50)	0,3	25 (54,30)	0,32
3DL1	5(83,3)	0,6	45(97,8)	1
2DS1	3 (50)	0,3	18 (39,1)	0,22
2DS2	3 (50)	0,3	28 (60,9)	0,37
2DS3	1 (16,7)	0,1	12 (26,1)	0,14
2DS4	5 (83,3)	0,6	42 (91,3)	0,71
2DS5	2 (33,3)	0,2	17(37,0)	0,21
3DS1	3 (50)	0,3	20 (43,50)	0,25
2DP1	6(100)	1	40 (87,0)	0,64

Masculinos: 6 individuos Femeninos: 46 individuos. F (%) = frecuencia
f= frecuencia génica. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.

Anexo 7. Tabla 17. Distribución de la frecuencia de genes KIR en individuos de sexo masculino.

Genes KIR	HAI n (%)	f	Sanos n (%)	f
2DL1	6 (100)	1	57 (98,3)	0,9
2DL2	2 (33,3)	0,2	30 (51,7)	0,3
2DL3	6 (100)	1	55(94,8)	0,8
2DL5	3(50)	0,3	36 (62,1)	0,4
3DL1	5(83,3)	0,6	51(87,9)	0,7
2DS1	3 (50)	0,3	26 (44,8)	0,6
2DS2	3 (50)	0,3	30 (51,7)	0,3
2DS3	1 (16,7)	0,1	18 (31)	0,2
2DS4	5 (83,3)	0,6	50 (86,2)	0,6
2DS5	2 (33,3)	0,2	18 (31)	0,2
3DS1	3 (50)	0,3	23 (39,7)	0,2
2DP1	6(100)	1		

HAI = 6 individuos. Sanos =58 individuos F (%) = frecuencia
 f= frecuencia génica OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.

Anexo 8. Tabla 18. Distribución de la frecuencia de genes KIR en individuos de sexo femenino.

Genes	HAI	f	Sanos	f	OR	p	95% IC
KIR	n (%)		n (%)				
2DL1	41 (89,1)	0,67	41 (100)	1	0,09	0,06	0,004866 -1,698
2DL2	22(47,8)	0,28	20(48,8)	0,3	0,96	1	0,4144 -2,235
2DL3	37(80,4)	0,56	38(92,7)	0,7	0,32	0,13	0,08139 -1,294
2DL5	25(54,30)	0,32	26(66,40)	0,4	0,68	0,51	0,2904- 1,624
3DL1	45(97,8)	1	39(95,1)	8	2,31	0,59	0,2013 – 26,451
2DS1	18 (39,1)	0,22	21 (51,2)	0,3	0,61	0,28	0,261- 1,435
2DS2	28 (60,9)	0,37	21 (51,2)	0,3	1,48	0,39	0,6319 – 3,473
2DS3	12 (26,1)	0,14	11 (26,8)	0,1	0,96	1	0,3706 -2,50
2DS4	42 (91,3)	0,71	39 (95,1)	0,8	0,53	0,67	0,0933- 3,10
2DS5	17(37,0)	0,21	20(48,8)	0,3	0,61	0,28	0,2613- 1,45
3DS1	20(43,50)	0,25	20(48,8)	0,3	0,80	0,67	0,3467 – 1,882
2DP1	40 (87,0)	0,64					

HAI = 46 individuos. Sanos =41 individuos F (%) = frecuencia
 f= frecuencia génica OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.