



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

**DETERMINACION DEL ALELO *HLA-B27* Y DE LOS GENES *KIR3D* EN PACIENTES  
CON DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESPONDILITIS ANQUILOSANTE**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Isabel Cristina García Márquez** como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

Tutoras:

Dra. Mercedes Fernández Mestre

Dra. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela

Mayo, 2015

## RESUMEN

La espondilitis anquilosante (EA) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta fundamentalmente a las articulaciones de la columna vertebral, las cuales tienden a soldarse entre sí, provocando una limitación de la movilidad. Diferentes estudios han demostrado una fuerte asociación entre la EA y la presencia de HLA-B27, asociación que varía entre grupos étnicos. La actividad de las células NK está definida por el balance entre señales activadoras e inhibitoras procedentes de sus receptores. Entre sus receptores, están los KIR, los cuales son únicos debido a su diversidad y capacidad de reconocer alotipos de antígeno de leucocito humano (HLA). Hasta el presente se han desarrollado pocos estudios experimentales que relacionan el papel de genes *KIR* en espondiloartropatías y su relación con HLA-B27. Sin embargo, el papel de los homodímeros de la cadena pesada de HLA-B27 y su posible reconocimiento por receptores KIR en la patogénesis de espondiloartritis han sido estudiados. Fundamentados en que la asociación de HLA-B27 con el desarrollo de la EA es una de las más fuertes y que diferentes estudios han propuesto un modelo en el cual los receptores KIR en sinergia con las moléculas HLA generan genotipos compuestos que proporcionan diferentes niveles de activación e inhibición de las células NK o T, nos planteamos: determinar la presencia del alelo *HLA-B27* y de los genes de receptores *KIR* (*3DL1*, *3DS1* y *3DL2*) en pacientes con diagnóstico presuntivo de EA. Para ello determinamos la frecuencia del alelo *HLA-B27* y de los genes *KIR3D* en 96 individuos con diagnóstico presuntivo de EA, las cuales se compararon con las descritas en población venezolana sana. Nuestros resultados demostraron que el alelo *HLA-B27* es un factor que confiere riesgo a desarrollar EA. Asimismo, los individuos que presentan el gen *KIR3DL1* y/o la combinación ***KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Presente*** son menos propensos a desarrollar EA, debido posiblemente a la inhibición, de la actividad de las células NK/células T, mediada por el receptor *KIR3DL1*. Finalmente, los individuos con la combinación ***KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Ausente*** son más propensos a desarrollar EA. En conclusión la actividad de las células NK está regulada por el balance entre señales activadoras e inhibitoras procedentes de sus receptores. Por lo tanto, un desequilibrio entre los genes KIR activadores e inhibidores podría influir en la patogénesis de la EA, por una sobre activación o por la pérdida de inhibición.

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo, quiero agradecer a mis padres, Luis y Pilar por haberme guiado, motivado y apoyado en todo momento. A mis hermanos, Mariale y Luisito por siempre haber estado presentes cuando los he necesitado. Este logro es tan mío como de ustedes, los amo.

A la Universidad Central de Venezuela, por abrirme sus puertas y darme lo mejor de ella. Siempre será un orgullo infinito, y una gran responsabilidad haber egresado de esta prestigiosa casa de estudios.

Agradezco a la Doctora Mercedes Fernandez-Mestre, mi maestra, mi tutora, una persona inigualable y hermosa por sus consejos y enseñanzas, por guiarme durante todo este proceso, resolver los problemas, por tenerme tanta paciencia y sin duda alguna por darle forma a este trabajo. Gracias infinitas, sin usted no habría logrado esto.

Al Instituto de Investigaciones Científicas. Específicamente al laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental , por permitirme realizar mi trabajo especial de grado. A mis compañeros de laboratorio, Eva Salazar, Fernando Hernandez, Omar Balbás, sin ellos no lo habría logrado, gracias por su paciencia y dedicación.

Un especial agradecimiento a mi asesora académica la Doctora Guillermina Alonso, por su dedicación, orientación, por todos esos consejos y por ser tan excelente profesora y amiga.

A mis jurados, la Doctora Zelandia Fermin y la Doctora Annamil Trotta, por sus numerosos aportes, que sin duda ayudaron a mejorar el presente trabajo.

A mis amigos que durante todo este tiempo me acompañaron, a Ninoska Ruiz por haber entrado a mi vida para quedarse a Adriana Pizzi. Luis E. García. Gabriel Moccia. Jeackes Leañes. Adriana y Grecia Botello. A mis amigos Ucevistas que estuvieron conmigo durante

toda la carrera, por todos esos momentos en los que compartimos y por haber crecido conmigo. Especialmente quiero agradecer a Victoria Cabrera. Daniel Ortiz. Lila García. Andrea Moncada. Eloisa Lara. Alfredo Castilla. Ivan Lau. Jennire Sagasti y Adriana Rojas.

Le dedico mi trabajo a mis abuelitos Luis García y Darío Márquez que se que desde el cielo me acompañan, a mis abuelitas Margotica y Teresita que siempre estuvieron pendientes y preocupadas por mí.

Le agradezco a mis tíos y primos y a todos aquellos quienes de una u otra forma contribuyeron en la construcción de este primer proyecto, mi Trabajo Especial de Grado.

## INDICE

RESUMEN .....	ii
ABREVIACIONES.....	vi
INTRODUCCIÓN .....	12
ANTECEDENTES.....	28
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	32
OBJETIVOS.....	33
Objetivo General.....	33
Objetivos Específicos.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
RESULTADOS.....	42
DISCUSION.....	56
CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	66
ANEXOS.....	77

## ABREVIACIONES

Asn= Asparagina

$\beta$ 2-m=  $\beta$ 2 microglobulina

CREG= Grupo de reactividad cruzada

EA= Espondilitis Anquilosante

EAS= Espondiloartropatías Seronegativas

EDTA= Ácido etilen-diamino-tetra-acético

EOR= Respuesta de sobrecarga en el Retículo endoplasmático

HLA= Antígeno Leucocitario Humano

KDa= Kilo Dalton

KIR= Receptores tipo inmunoglobulina de las células NK

IL= Interleuquina

Ile: Isoleucina

ITAM: motivo activador basado en tirosina

ITIMs= Motivos inhibitorios basados en tirosina

IFN= Interferón

LIR= Receptor inhibidor de leucocitos

LRC= Complejo de receptor leucocitario

MHC= Complejo principal de histocompatibilidad

NaCl= Cloruro de sodio

NCRs: Receptores de citotoxicidad natural

NLB= Buffer de lisis nuclear

NK= Células citotóxicas naturales

$p$ = Probabilidad

PCR-SSP= Reacción en cadena polimerasa con iniciadores de secuencias específicas.

RCLB= Buffer de lisis de glóbulos rojos

RE= Retículo endoplasmático

Ser= Serina

TE= Buffer de Tris-EDTA

Thr: Treonina

TNF= Factor de necrosis tumoral

U= Unidad

UPR= Respuesta a la proteína desplegada

$\chi^2$ = ji cuadrado

## INDICE DE FIGURAS

### Figura

1. Mapa genético del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el humano.....13
2. Diagrama esquemático de la molécula MHC clase I, mostrando los dominios externos, dominio transmembrana y la cola citoplasmática.....15
3. Principales diferencias estructurales entre los diferentes miembros de la familia de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR)..... 18
4. Estructura de 9 exones del gen *KIR* ancestral.....19
5. Haplotipos *KIR* definidos por secuenciación genómica.....20
6. Radiografías mostrando ejemplos de la clasificación radiográfica de sacroileítis.....24
7. Hipótesis actuales que asocian HLA-B27 con espondiloartropatías..... 26
8. Diagrama esquemático de la hendidura de unión del péptido de la molécula HLA-B27 con un péptido unido (azul claro). .....30
9. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X.....42

<b>10.</b> Producto amplificado correspondiente al alelo <i>HLA-B27</i> visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X.....	43
<b>11.</b> Producto amplificado correspondiente al gen <i>KIR3DL1</i> visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X.....	44
<b>12.</b> Producto amplificado correspondiente al gen <i>KIR3DS1</i> visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X.....	45
<b>13.</b> Producto amplificado correspondiente al gen <i>KIR3DL2</i> visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X.....	46
<b>14.</b> Distribución de la frecuencia del alelo <i>HLA-B27</i> en individuos con diagnóstico presuntivo de EA y población general venezolana.....	57
<b>15.</b> Distribución de frecuencia del gen <i>KIR3DL1</i> entre individuos con diagnóstico presuntivo de EA y población general venezolana .....	59
<b>16.</b> Distribución de la frecuencia de la combinación <i>KIR3DS1</i> Ausente/ <i>KIR3DL1</i> Presente entre individuos con diagnóstico presuntivo de EA y población general venezolana.....	63
<b>17.</b> Distribución de la frecuencia de la combinación <i>KIR3DS1</i> Ausente/ <i>KIR3DL1</i> Presente entre individuos con diagnóstico presuntivo de EA y población general venezolana.....	64

## INDICE DE TABLAS

I.	Nomenclatura de loci y alelos HLA .....	14
II.	Productos de genes <i>KIR</i> y sus ligandos HLA.....	22
III.	Estudios poblacionales que muestran el papel de la variabilidad de los genes <i>KIR</i> en el desarrollo de espondilitis anquilosante (EA).....	31
IV.	Secuencia de los iniciadores utilizados para la detección de HLA-B27. .....	37
V.	Secuencias de los iniciadores utilizados para la determinación de los genes <i>KIR3DS1</i> y <i>KIR3DL1</i> . .....	39
VI.	Secuencias de los iniciadores utilizados para la determinación del gen <i>KIR3DL2</i> . .....	40
VII.	Tabla de contingencia 2x2.....	41
VIII.	Distribución de la frecuencia del alelo <i>HLA-B27</i> en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis Anquilosante.....	47
IX.	Distribución de la frecuencia del gen <i>KIR3DL1</i> en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante.....	47
X.	Distribución de la frecuencia del gen <i>KIR3DS1</i> en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante.....	48
XI.	Distribución de la frecuencia del gen <i>KIR3DL1</i> en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo <i>HLA-B27</i> .....	49

XII.	Distribución de la frecuencia del gen <i>KIR3DS1</i> en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo <i>HLA-B27</i> .....	50
XIII.	Distribución de combinaciones génicas en individuos con diagnóstico presuntivo de acuerdo al alelo <i>HLA-B27</i> .....	51
XIV.	Distribución de combinaciones génicas individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante y <i>HLA-B27</i> positivo.....	52
XV.	Distribución de combinaciones génicas individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante y <i>HLA-B27</i> negativo.....	53
XVI.	Comparación de la frecuencia del gen <i>KIR3DL1</i> entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo <i>HLA-B27</i> ....	53
XVII.	Comparación de la frecuencia del gen <i>KIR3DS1</i> entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo <i>HLA-B27</i> .....	54
XVIII.	Comparación de la frecuencia de las combinaciones génicas <i>KIR3DL1/KIR3DS1</i> entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo <i>HLA-B27</i> .....	55

## INTRODUCCIÓN

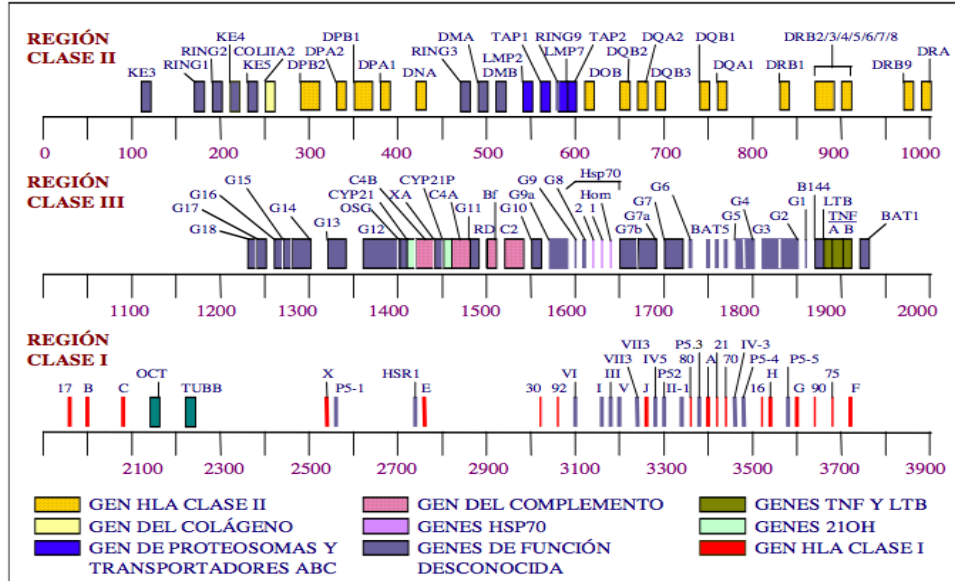
### **Complejo principal de Histocompatibilidad**

El complejo principal de histocompatibilidad es un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21). En humanos este complejo es denominado complejo HLA (antígeno de leucocito humano), el cual está organizado en tres regiones codificantes de distintas moléculas (Figura 1):

**Genes MHC clase I:** codifican glicoproteínas expresadas en la superficie celular de casi todas las células nucleadas. La función principal de los productos de los genes clase I es la presentación de péptidos antigénicos a las células T citotóxicas.

**Genes MHC clase II:** codifican glicoproteínas expresadas principalmente en células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y células B). La función de los productos de los genes clase II es la presentación de péptidos antigénicos a las células T cooperadoras.

**Genes MHC clase III:** codifican varias proteínas secretadas que cumplen funciones inmunitarias, incluye componentes del sistema de complemento y moléculas involucradas en inflamación (Revisado en: Kuby y col., 2006).



**Figura 1.** Mapa genético del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el humano. El complejo MHC es denominado como complejo HLA en humanos. El complejo es organizado en regiones codificantes de los productos clase I, clase II y clase III. Los productos de los genes clase III incluye, entre otros, las proteínas del complemento (C') y los factores de necrosis tumoral (TNF $\alpha$  y TNF- $\beta$ ) (Tomado de: Muro y col., 2008)

### Región HLA clase I

En humanos, la región clase I abarca, aproximadamente, 2000 kb de longitud y contiene alrededor de 20 genes, incluyendo los tres loci codificantes de las moléculas clase I clásicas, denominados HLA-A, HLA-B y HLA-C. Estos genes son altamente polimórficos, con 2946 alelos para *HLA-A*, 3693 para *HLA-B* y 2466 para *HLA-C* (<http://hla.alleles.org> en línea). La designación de los genes MHC humanos usa una nomenclatura que incluye la letra del locus seguido por un número de 4 dígitos (o más) (por ejemplo, HLA-A\*0101, HLA-A\*0201, ambos son alelos de HLA-A) (Paul WE., 2008) (Tabla I)

**Tabla I. Nomenclatura de loci y alelos HLA**

---

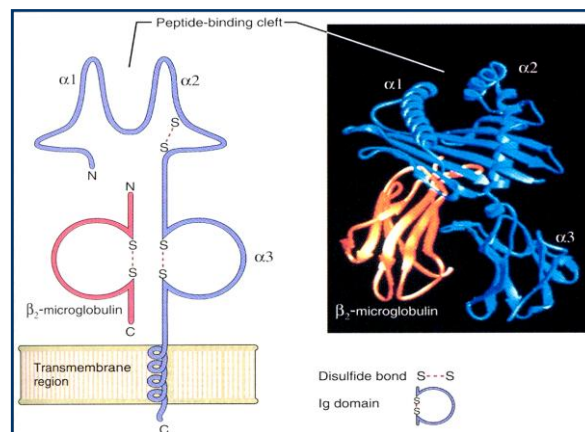
<b>Definición de la nomenclatura</b>	
HLA	La región HLA y prefijo para un gen HLA
HLA-B	Un locus HLA particular, por ejemplo -B
HLA-B*27	Un grupo de alelos que codifican el antígeno B27 definido serológicamente o mediante cultivos mixtos de linfocitos
HLA-B*2701	Un alelo HLA específico
HLA-A*409N	Un alelo nulo
HLA-A*3014L	Un alelo codificante de una proteína con una reducida o baja expresión en la superficie celular
HLA-A*4020102L	Un alelo codificante de una proteína con una reducida o baja expresión en la superficie celular, donde la mutación se encuentra fuera de la región codificante
HLA-B*44020102S	Un alelo codificante de una proteína que es expresada únicamente como molécula secretada

---

Los alelos que no son expresados “alelos nulos” tienen el sufijo “N.” Aquellos alelos que son expresados alternativamente, pueden tener el sufijo “L,” “S,” “C,” “A,” o “Q.” El sufijo “L” es usado para indicar un alelo que tiene una baja expresión en la superficie celular. El sufijo “S” es usado para denotar un alelo específico para una proteína que es expresada como una molécula soluble “secretada”, pero no está presente en la superficie celular. Un sufijo “C” indica un alelo cuyo producto está presente en el citoplasma, pero no en la superficie celular. Un sufijo “A” indica una “expresión aberrante”. Un sufijo “Q” es usado cuando la expresión del alelo es cuestionable. ([www.ebi.ac.uk/imgt/hla/nomenclature/index.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/nomenclature/index.html))

## Estructura de las moléculas clase I

Las moléculas clase I están formadas por una cadena  $\alpha$  pesada de 45-kilodalton (kDa) asociada no covalentemente con una cadena de 12-kDa, llamada  $\beta$ 2-microglobulina (Figura 2). La cadena  $\alpha$  es una glicoproteína transmembrana codificada por genes polimórficos (HLA-A, -B y -C) localizados en la región clase I del complejo HLA. La  $\beta$ 2-microglobulina es una proteína codificada por un gen altamente conservado localizado en un cromosoma diferente. La asociación de la cadena  $\alpha$  con la  $\beta$ 2-microglobulina es requerida para la expresión de las moléculas clase I en la superficie celular. Análisis estructurales han revelado que la porción extracelular de la cadena alfa de las moléculas HLA clase I está organizada en tres dominios ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3), cada uno de aproximadamente 90 aminoácidos, seguido por un dominio transmembrana de alrededor de 25 aminoácidos hidrofóbicos y una cola citoplasmática de 30 aminoácidos. La  $\beta$ 2-microglobulina es similar en tamaño y organización al dominio  $\alpha$  3, pero no contiene una región transmembrana y está unida no covalentemente a la glicoproteína clase I (cadena  $\alpha$ ) (Revisado en: Kuby, 2006)



**Figura 2. Diagrama esquemático de la molécula MHC clase I, mostrando los dominios externos, dominio transmembrana y la cola citoplasmática.** La cadena  $\alpha$  está anclada a la membrana por su segmento transmembrana hidrofóbico, seguido por la cola citoplasmática. Los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de la cadena alfa forman la hendidura de unión del péptido (Tomado de: Murphy y col., 2009).

## **Células citotóxicas naturales (NK)**

Las células citotóxicas naturales (NK) son componentes celulares de la respuesta inmunitaria innata siendo la primera línea de defensa contra virus, bacterias, tumores y microorganismos (Jobim y col., 2008). Originalmente fueron descritas en base a su función citotóxica y posteriormente por su morfología de linfocitos grandes y granulares, con habilidad de lisar células caracterizadas por una expresión deficiente o alterada de moléculas MHC Clase I (células tumorales y células infectadas viralmente) sin necesidad de sensibilización previa, originando así el término de “citotoxicidad natural” e introduciendo la hipótesis de “pérdida de lo propio” (Lanier, 2008). Recientemente, se ha revisado esta hipótesis planteando que las células NK vigilan no solo las células que pierden la expresión de las moléculas HLA-clase I, sino aquellas que sobre expresan los ligandos para los receptores activadores expresados por las células NK. El resultado de la interacción de las células NK con las células blanco está determinado por el conjunto de receptores activadores e inhibidores expresados en la célula NK, como de ligandos en la célula blanco, así como la suma de las fuerzas de señales traducidas (Lanier, 2008).

Al igual que otros leucocitos, las células NK son reclutadas en el tejido inflamado por citoquinas, quimioquinas, y otros factores quimiotácticos, pudiendo ser activadas por IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha/\beta$ , favoreciendo su proliferación, citotoxicidad y/o producción de IFN- $\gamma$  (Lanier, 2008 ; Hallet y Murphy., 2008). Además, de su actividad citotóxica, las células NK han sido descritas como células reguladoras debido a su influencia sobre otros tipos celulares, como células dendríticas, macrófagos, linfocitos T, B y células epiteliales (Newman y Riley., 2007; Vivier y Col., 2008).

## **Receptores de las células NK**

Las células NK poseen una variedad de receptores cuya función es el reconocimiento e interacción con moléculas HLA clase I. La interacción de receptores de las células NK con sus ligandos HLA resulta en una inhibición o activación de los mecanismos efectores de las células NK sobre una célula blanco. Bajo ciertos estímulos las células NK sintetizan una gran variedad de receptores de superficie y sus interacciones son

dirigidas de manera preferente, pero no exclusiva, hacia células hematopoyéticas, en particular células dendríticas (Parham, 2005).

En la etapa inicial de la maduración, las células (todavía inmaduras) no expresan receptores inhibidores, a pesar de que expresan receptores activadores y una actividad citolítica eficiente (Farag y col., 2003).

La actividad de las células NK está finamente regulada por un grupo de receptores activadores e inhibidores, cuyo balance final, luego de interactuar con su ligando específico, favorecerá o no a la activación de la célula frente a la célula blanco (Lanier, 2008). En humanos los receptores de las células NK (NKR) pueden ser divididos en dos clases:

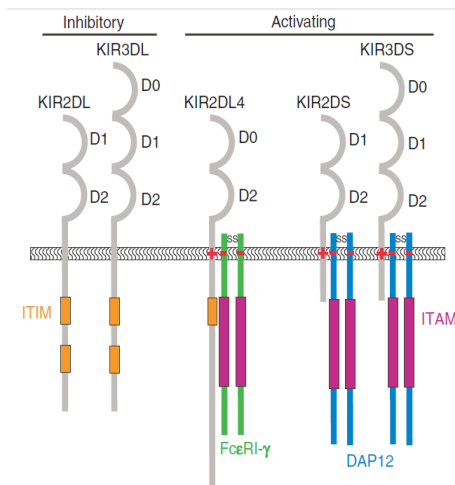
1. Receptores NK específicos para moléculas HLA-clase I. Este grupo incluyen dos sub-grupos de receptores: los receptores pertenecientes a la familia de inmunoglobulinas (KIR, LIR o LILRs) y los receptores pertenecientes a la familia de las lectinas tipo I (CD94/NKG2),

2. Receptores NK-HLA independientes. Este grupo incluye los receptores de citotoxicidad natural (NCRs) (Landaeta., 2010).

### **Receptores de las células NK tipo inmunoglobulinas (KIR)**

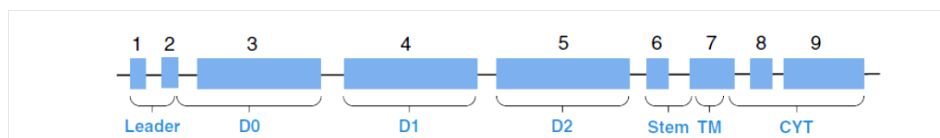
Los KIR, por killer inmunoglobulin like receptors, son glicoproteínas de membrana, pertenecientes a la súper-familia de las inmunoglobulinas, expresadas en la superficie de las células NK y sobre sub-poblaciones de linfocitos T (Revisado en: Landaeta y col., 2010). Estas moléculas modulan la función celular bajo el reconocimiento de su ligando, las moléculas HLA clase I expresadas en la célula blanco (Gardiner, 2007). Estructuralmente, los receptores KIR presentan una región extracelular, constituida por dominios tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (Figura 3). Basado en el número de dominios extracelulares, pueden clasificarse en receptores que presentan 2 dominios (KIR2D) y receptores con 3 dominios (KIR3D). Las características estructurales de los KIR se relacionan con su función y permite clasificarlos en KIR inhibidores y activadores. Los receptores inhibidores presentan una región citoplasmática larga (L) y

contiene motivos inhibitorios basados en tirosina (ITIMs). Cuando el residuo de tirosina es fosforilado, éste se enlaza a una fosfatasa (SHIP-1) y transduce una señal inhibitoria que bloquea la cascada de activación de señal generada por los diferentes receptores activadores expresados en la célula NK. Los receptores KIRs activadores presentan una región citoplasmática corta (S) y un aminoácido cargado positivamente (Lisina o Arginina), el cual permite la asociación con moléculas adaptadoras (DAP-12/KARAP, FcεRI-γ), que poseen un motivo activador basado en tirosina (ITAM), el cual traduce señales activadoras (Carrington y Norman, 2005).



**Figura 3. Principales diferencias estructurales entre los diferentes miembros de la familia de receptores tipo inmunoglobulina (KIR).** Los KIR pueden ser divididos en tres principales subgrupos: los receptores inhibitorios, los receptores activadores y un único receptor activador conocido como KIR2DL4. La nomenclatura de los KIR está basada en el número de dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (2D o 3D) y la longitud del dominio citoplasmático (L para cola larga y S para cola corta). Los receptores con dominios citoplasmáticos largos contienen uno o dos motivos inhibitorios basados en tirosina (ITIMs) (naranja), que proporcionan función inhibitoria. Los KIR con cola citoplasmática corta y el KIR2DL4 de cola larga son receptores activadores, los cuales contienen un aminoácido básico (+) dentro del dominio transmembrana que interactúa con un aminoácido ácido (-) dentro de los dominios transmembrana de las proteínas de señalización adaptadora DAP12 (azul) o FcεRI-γ (verde), respectivamente. Estos adaptadores proporcionan motivos activadores basados en tirosina (ITAMs) (púrpuras) que permiten la activación de la función (Tomado de: Campbell y col., 2011).

La familia de los receptores KIR en humanos se encuentra codificada por 15 genes y dos pseudogenes ubicados en una región de 150 Kb aproximadamente, en el complejo de receptor leucocitario (LRC) localizado en el brazo largo del cromosoma 19 humano (19q13.4) (Lewis, 2005). Estos 15 genes poseen regiones promotoras independientes localizadas hasta 500 pares de bases (pb) antes del primer codón de transcripción. La estructura de dichos genes comprende un arreglo básico que consiste en 9 exones: los dos primeros exones que codifican la secuencia señal, los exones 3 al 5 que codifican para un dominio tipo inmunoglobulina (D0, D1, D2, respectivamente), los exones 6 y 7 que codifican el péptido conector y la región transmembrana y por último, los exones 8 y 9 que codifican la cola citoplasmática (Figura 4) (Revisado en: Torres- García, 2008).



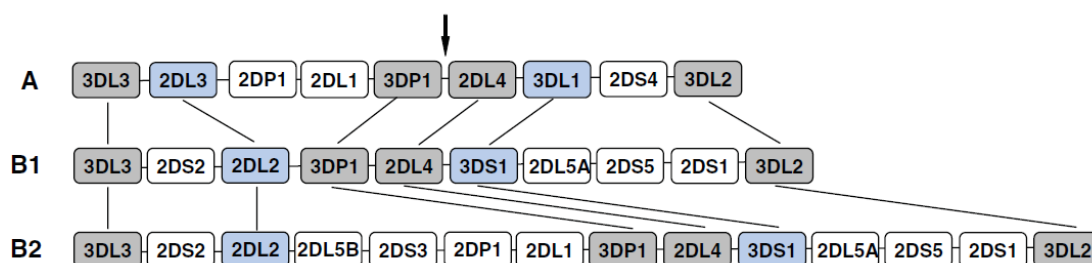
**Figura 4. Estructura de 9 exones del gen *KIR* ancestral.** La organización exón-intrón se correlaciona estrechamente con el dominio funcional (Tomado de: Bashirova y col., 2006)

### Diversidad Haplotípica

La variación en el contenido génico es una de las características principales del complejo KIR. A pesar de esta variabilidad, análisis de segregación y datos de secuencia han revelado algunas características sistemáticas en la organización del complejo *KIR*. En prácticamente todos los haplotipos se pueden encontrar cuatro genes *KIR*, *3DL3*, *3DP1*, *2DL4* y *3DL2*, por lo tanto, han sido llamados loci estructurales o framework. Múltiples eventos de recombinación recíproca parecen haber ocurrido dentro de una región única entre *3DP1* y *2DL4*, resultante en el intercambio de mitades centroméricas y teloméricas del complejo (Revisado en: Bashirova y col., 2006).

Basados en el contenido de genes se distinguen dos grupos básicos de haplotipos: Haplotipo A y B (Figura 5). El haplotipo A contiene 9 genes *KIR* y su secuencia genómica está representada por dos clones genómicos en el GenBank. Una característica del haplotipo A es la presencia de un solo gen *KIR* codificante de un KIR cola corta, *2DS4*, el

cual con frecuencia muestra una eliminación del marco de lectura en el exón 5 y no codifica una proteína de membrana. Aunque los haplotipos A son fijos, en términos del número y tipo de genes presentes, muestran una alta variabilidad alélica en varios de los genes. En contraste, los haplotipos B exhiben una amplia diversidad en términos de contenido de genes y polimorfismo alélico. Se han secuenciado dos haplotipos B a partir de clones genómicos individuales (Figura 5, haplotipos B1 y B2). Basado en análisis de segregación, se han descrito más de 20 haplotipos B diferentes. Estos haplotipos contienen varias combinaciones de genes KIR, incluyendo varios genes KIR activadores. *2DL2* y *2DL3* se segregan como alelos de un mismo locus, a pesar de que originalmente se pensó que representaban dos genes distintos. Lo mismo ocurre para *3DS1* y *3DL1*. Casi todos los haplotipos contienen estos dos loci, de tal manera que prácticamente cada individuo tiene *2DL2* ó *2DL3* y *3DL1* ó *3DS1* dentro de su repertorio KIR. Por lo tanto, estos dos loci pueden ser considerados como loci estructurales adicionales, junto con *3DL3*, *3DP1*, *2DL4*, y *3DL2* (Revisado en: Bashirova y col., 2006).



**Figura 5. Haplotipos KIR definidos por secuenciación genómica.** Se muestra un haplotipo del grupo A y dos haplotipos del grupo B. Los genes *2DL2/3DL3* y *3DL1/3DS1* (de color azul) están presentes en casi todos los haplotipos KIR. Con una flecha se indica la zona de recombinación simétrica frecuente entre las partes centroméricas y teloméricas del complejo KIR (Tomado de: Bashirova y col., 2006)

## **KIR y sus ligandos**

Tanto los KIRs inhibidores como los activadores, reconocen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresadas en la superficie de la célula blanco. Las especificidades de los KIR inhibidores por sus ligandos HLA clase I han sido claramente definidas en algunos casos (Vilches y Parham, 2002; Bashirova y col., 2006). Los KIR2DL2/3 y KIR2DL1 reconocen dos grupos de alelos HLA-C mutuamente excluyentes, el grupo HLA-C1 y el HLA-C2, los cuales se distinguen por un dimorfismo en la posición 80 del dominio  $\alpha$ 1 del HLA-Cw. El grupo HLA-C1 (HLA-C1) que incluye los alotipos HLA-Cw\*01, -03, -07, -08, -12, -13, -14 y -16, está caracterizado por la presencia del aminoácido serina en la posición 77 y asparagina en posición 80 (Ser77/Asn80, correspondiente al epítipo C1) y el grupo HLA-C2 (HLA-C2), que incluye los alotipos HLA-Cw\*02, -04, 05, -06, -15, -1602, -17, y -18, está caracterizado por presentar una asparagina en posición 77 y una lisina en posición 80 (Asn77/Lys80, correspondiente al epítipo C2) (Biassoni y col., 1995; Colonna y col., 1993). KIR3DL1 interacciona con los alotipos HLA-B que presentan el motivo Bw4 definido serológicamente (HLA-Bw4), el cual difiere en especificidad de Bw6 por el polimorfismo en las posiciones 77 y 80 (Gumperz y col., 1995). KIR3DL2 interacciona con los alelos HLA-A3 y A11 (Döhning y col., 1996), mientras que KIR2DL4 une la molécula no clásica clase-I: HLA-G (Rajagopalan y Long., 1999). Por otra parte, las especificidades de los KIR activadores ha sido difícil de definir, basado en la similitud de sus dominios extracelulares se considera que KIR2DS1, 2DS2, y 3DS1 presentan la misma especificidad de ligando que su contraparte inhibidora, aunque sus interacciones son mucho más débiles (Biassoni y col., 1997; Valés-Gómez y col., 1998). KIR2DS4 reconoce HLA-Cw4, pero no HLA-Cw6, aunque los dos alelos pertenecen al grupo HLA-C2 (Katz y col., 2001). Evidencias indirectas sugieren que al igual que KIR3DL1, KIR3DS1 puede reconocer HLA-Bw4, aunque la interacción directa no ha sido descrita (Martin y col., 2002; Alter y col., 2007) (Tabla II).

**Tabla II. Productos de genes *KIR* y sus ligandos HLA**

Nombre del gen	Designación CD	Número de alelos <sup>1</sup>	Motivos reconocidos en los ligandos HLA	Alelos de ligandos HLA
<i>KIR2DL1</i>	CD158a	26	HLA-C grupo 2	Grupo 2: C*02, C*04, C*05, C*06
<i>KIR2DL2</i>	CD158b1	15	HLA-C grupo 1, algunos HLA-C grupo 2 y HLA-B	Grupo 1: C*01, C*03, C*07, C*08. Grupo 2: C*0501, C*0202. B*4601 y B*7301
<i>KIR2DL3</i>	CD158b2	11	HLA-C grupo 1, algunos HLA-C grupo 2 y HLA-B	Grupo 1: C*01, C*03, C*07, C*08. Grupo 2: C*0501, C*0202. B*4601 y B*7301
<i>KIR3DL1</i>	CD158e1	59	Epítomos Bw4 entre alotipos HLA-B y algunos HLA-A	B*08, B*27, B*57, A*24
<i>KIR3DL2</i>	CD158k	25	Ciertos alotipos HLA-A	A*03, A*11
<i>KIR3DL3</i>	CD158z	56	Desconocido	
<i>KIR2DL5A</i> <sup>2</sup>	CD158f	10	Desconocido	
<i>KIR2DL5B</i> <sup>2</sup>	CD158f	21	Desconocido	
<i>KIR2DL4</i>	CD158d	27	Ciertos alotipos HLA-A	A*03, A*11
<i>KIR2DS1</i>	CD158h	15	HLA-G <sup>3</sup>	
<i>KIR2DS2</i>	CD158j	20	HLA-C grupo 2	Grupo 2: C*02, C*04, C*05, C*06
<i>KIR2DS3</i>	No designado	10	HLA-C grupo 1	Grupo 1: C*01, C*03, C*07, C*08.
<i>KIR2DS4</i>	CD158i	30	HLA-C (grupo 1 y 2), A*11	Grupo 1: C*01, C*03, C*07, C*08. C*0501, C*0202, C*1601, A*1102
<i>KIR2DS5</i>	CD158g	14	Desconocido	
<i>KIR3DS1</i>	CD158e2	16	HLA-Bw4? <sup>4</sup>	

<sup>1</sup>Los alelos pueden encontrarse en <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>.

<sup>2</sup>El gen *KIR2DL5* es duplicado y codificado por dos loci separados dentro del clúster génico LRC.

<sup>3</sup>HLA-G molécula HLA-clase I no clásica.

<sup>4</sup>Hay conflictos que HLA-Bw4 sea ligando de 3DS1. (Tomado de: Campbell y col., 2011)

## **Espndilitis Anquilosante**

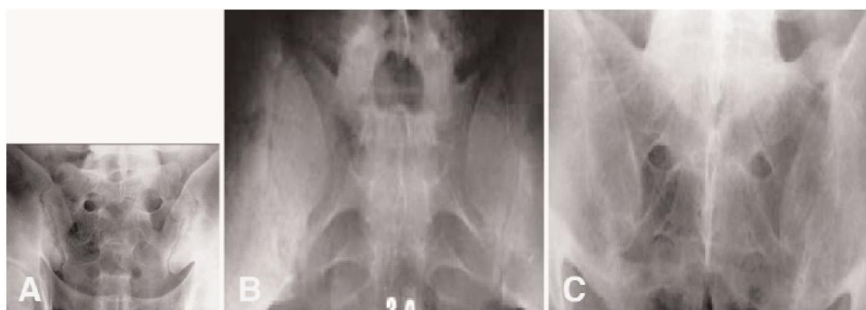
Las espondiloartropatías seronegativas (EAS) constituyen un grupo de artritis inflamatorias, con negatividad para el factor reumatoide y para los anticuerpos antinucleares, cuyo denominador común son la afectación de las articulaciones periféricas y axiales, entesitis, diversas manifestaciones extra articulares y positividad para el antígeno leucocitario humano: HLA-B27 (Revisado en: González Cortiñas., 1998). La EAS incluyen la espondilitis anquilosante (EA), el síndrome de Reiter/ artritis reactiva, espondilitis asociada con psoriasis, artropatías enteropáticas, espondiloartropatías juveniles, síndrome SAPHO, uveítis anterior aguda, así como una variedad menor, no bien definida, denominada espondiloartropatía indiferenciada, y las EAS de inicio tardío (Revisado en: González Cortiñas., 1998)

La espondilitis anquilosante (EA) es una enfermedad compleja, que involucra múltiples factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales. Los pacientes con EA son predominantemente hombres jóvenes y la enfermedad se caracteriza por la inflamación y anquilosis, principalmente en la interfase cartílago-hueso y entesis. El diagnóstico de esta patología se basa en los siguientes criterios:

1. Criterios clínicos.
  - a) dolor lumbar y rigidez. Con más de 3 meses de duración, que mejora con el ejercicio, pero que no se alivia con el reposo,
  - b) limitación de la movilidad de la columna vertebral lumbar, tanto en el plano sagital y frontal,
  - c) expansión limitada del tórax, que provoca una disminución de la función de los pulmones
2. Criterios radiológicos.

Sacroileítis (inflamación de la articulación sacroilíaca) grado dos o superior bilateralmente, o de grado tres o superior unilateralmente. La clasificación radiográfica de sacroileítis consiste de cinco grados: Grado 0: columna vertebral normal; Grado I: cambios sospechosos en la columna vertebral; Grado II: esclerosis

con un poco de erosión; Grado III: erosiones graves, pseudo-dilatación del espacio articular y anquilosis parcial; y Grado IV: denota anquilosis completa (Figura 6) (Dakwar y col., 2008).



**Figura 6. Radiografías mostrando ejemplos de la clasificación radiográfica de sacroileítis.**

Grado II (A), Grado III (B) y Grado IV (C.) (Tomado de: Dakwar y col., 2008).

El diagnóstico de la EA es definitivo cuando un criterio radiológico (sacroileítis) se asocia con al menos un criterio clínico. Un diagnóstico presuntivo es considerado si existen los tres criterios clínicos o un criterio radiológico asociado sin signos o síntomas que satisfacen el criterio clínico (Revisado en: Dakwar y col., 2008). Sin embargo, como los cambios radiológicos aparecen con una demora más o menos prolongada con respecto al inicio de los síntomas, se ha recurrido a la realización de determinados análisis de sangre para apoyar el diagnóstico (por ejemplo, determinación de la presencia del antígeno HLA-B27) o para determinar la intensidad mayor o menor del proceso inflamatorio que sufre el paciente (Smith y col., 2012).

HLA-B27 constituye el principal marcador de susceptibilidad de la EA (Tsui y col., 2014). La presencia de este antígeno supone una probabilidad de 1-2% de padecer EA, la cual aumenta hasta 10-20% sí, además, de ser B27 positivo, existe un familiar de primer grado que padece la enfermedad. Alrededor de un 80-95% de las personas caucásicas con EA presentan el antígeno HLA-B27, por lo que establecer una relación entre su presencia y el desarrollo de la enfermedad ha sido objetivo de numerosas investigaciones (Revisado en: Castro-Santos y col., 2014).

### **Asociación entre Espondilitis Anquilosante y HLA-B27**

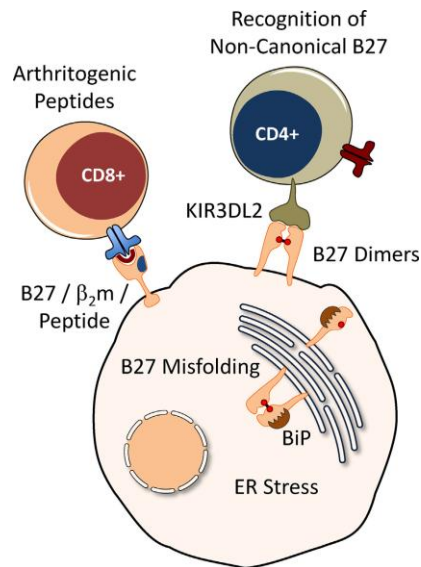
Han pasado más de 40 años desde el descubrimiento de la asociación del antígeno HLA-B27 con la espondilitis anquilosante, pero el papel patogénico del gen y su producto permanecen sin resolver (Revisado en: Castro-Santos y col., 2014). Asimismo, no todos los subtipos HLA-B27 están igualmente asociados a la EA, sugiriendo que el polimorfismo podría modular la susceptibilidad a la enfermedad. Se ha descrito que la molécula de HLA-B27 favorece el desarrollo de las lesiones inflamatorias articulares y extra articulares de este síndrome y hasta la fecha se han identificado más de 100 subtipos de HLA-B27, los cuales difieren por una o más sustituciones de aminoácidos (Revisado en: Ting y col., 2014). Diferentes estudios poblacionales han descrito que los subtipos B\*27:02 y B\*27:05 están fuertemente asociados con predisposición a desarrollar EA, otros que los subtipos B\*27:01, B\*27:02, B\*27:04, B\*27:05, B\*27:7, B\*27:08, B\*27:14, B\*27:15, y B\*27:19 son los predisponentes a EA, mientras que B\*27:06 y B\*27:09 no se han asociado con esta patología (Dazhi y col., 2014). Finalmente, cabe destacar que hay considerables diferencias étnicas en la prevalencia de HLA-B27 a nivel mundial (Revisado en: Ting y col., 2014).

Considerando que las moléculas HLA clase I unen un amplio repertorio de antígenos peptídicos, principalmente provenientes de la degradación de proteínas endógenas, y que los presentan en la superficie celular para que sean reconocidos por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, parece lógico suponer que el papel patogénico de HLA-B27 podría estar relacionado con sus características presentadoras de antígeno y con el reconocimiento de éstos por la células T (Revisado en: Castro-Santos y col., 2014).

### **Características poco comunes de HLA-B27**

Tres características principales diferencian las moléculas HLA-B27 de las otras moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I. Estas características incluyen la especificidad de unión al péptido, la tendencia a plegarse inadecuadamente y la preferencia en la formación de homodímeros de cadenas pesadas

(cadena  $\alpha$ ) durante el reciclaje de la superficie celular (Colbert y col., 2014). Cada una de estas características juega un papel independiente en la patogénesis de la espondiloartritis, que se resumen en la Figura 7.



**Figura 7. Hipótesis actuales que asocian HLA-B27 con espondiloartropatías.** (1) La hipótesis del péptido artritogénico, plantea que péptidos de antígenos externos podrían ser presentados por moléculas HLA-B27, desencadenando una respuesta mediada por células T CD8<sup>+</sup> induciendo autoinmunidad, daño tisular e inflamación. (2) La hipótesis de la expresión de cadenas aberrantes en la superficie celular, sugiere que dímeros de HLA-B27 son reconocidos por receptores tipo inmunoglobulina, como KIR3DL2 y receptores de la familia de las inmunoglobulinas de leucocitos (LILR), desencadenando inflamación. (3) La hipótesis del mal plegamiento de HLA-B27: plantea que la formación de los oligómeros mal plegados y la unión de la chaperona Bip a cadenas pesadas HLA-B27 recién sintetizadas causa estrés en el retículo endoplasmático rugoso, lo cual tiene efectos intrínsecos sobre la función celular que promueven el desarrollo de las espondiloartritis. HLA-B27 puede exhibir los tres comportamientos en la misma célula, y estos conceptos no son mutuamente excluyentes (Tomado de: Colbert y col., 2014)

La hipótesis del péptido artritogénico postula que el péptido patogénico específico, derivado de un órgano diana, es presentado a células T auto reactivas. Una variación de esta hipótesis es el "mimetismo molecular", donde un péptido con reacción cruzada, derivado de un patógeno bacteriano, estimula células T, las cuales pueden responder a un "auto-péptido" asociado a HLA-B27 o a péptidos derivados de la propia molécula de HLA-B27 (Revisado en: Antoniou y col., 2011)

La segunda hipótesis postula la expresión de cadenas  $\alpha$  pesadas aberrantes en la superficie celular. Varios estudios han demostrado que existen formas aberrantes de cadenas  $\alpha$  pesadas HLA-B27 en la superficie celular. Esto fue descrito por primera vez por Allen y colaboradores, quienes encontraron que la molécula HLA-B27 purificada y replegada *in vitro* sin  $\beta$ 2-microglobulina presentaba una tendencia a formar dímeros por enlaces di-sulfuros a través del residuo Cys 67 desapareado (Cys67). Estos dímeros son formados cuando en la superficie celular las cadenas pesadas pierden la  $\beta$ 2-microglobulina y sufren reciclaje endosomal. Además, hay evidencia de la existencia de cadenas  $\alpha$  pesadas HLA-B27 monoméricas, libres de  $\beta$ 2-microglobulina, relativamente estables en la superficie celular. Esas observaciones han guiado a la suposición de que receptores de moléculas MHC clase I en varios tipos de leucocitos pueden reconocer específicamente formas aberrantes de HLA-B27, lo cual pudiese guiar a una enfermedad inflamatoria a través de la modulación de la función leucocitaria (Revisado en: Smith y col., 2006). Entre los receptores leucocitarios que podrían reconocer las formas homodiméricas estarían LILRA1, LIRB2, KIR3DL1 y KIR3DL2. Se ha propuesto la hipótesis mediante la cual el reconocimiento de formas canónicas (heterodímeros) y no canónicas (homodímeros) de HLA-B27 por estos receptores específicos de NK podría tener un efecto inmuno-modulador en la enfermedad (Allen y Trowsdale, 2004). Que otros alelos formen dímeros en la superficie celular es menos claro, pero si se ha demostrado en moléculas HLA-B27 (Revisado en: Antoniou y col., 2011).

La tercera hipótesis propone que ciertas características bioquímicas de la molécula HLA-B27, principalmente su capacidad de mal plegarse, guía al desarrollo de espondiloartropatías. Esta hipótesis se conoce como la "hipótesis del mal plegamiento".

La hipótesis postula que la molécula HLA-B27 puede plegarse inadecuadamente en el retículo endoplasmático (RE) y guiar a un “incremento de la función de toxicidad” por inducir respuestas de estrés celular. Estas respuestas son conocidas como la respuesta a la proteína desplegada (UPR) y la respuesta de sobrecarga en el RE (EOR). Esto a su vez podría perturbar la función celular normal y dar lugar a la producción de citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen al desarrollo de las espondiloartropatías. La hipótesis del mal plegamiento ha llevado a la idea interesante de que las espondiloartropatías podrían ser reclasificadas como auto-inflamatorias en lugar de autoinmunitarias. Tales enfermedades auto-inflamatorias se caracterizan por inflamación en ausencia de auto-anticuerpos y células T antígeno específicas, los cuales son dos criterios que las espondiloartropatías parecen cumplir (Revisado en: Antoniou y col., 2011).

Cabe destacar, que existen otros mecanismos por los que HLA-B27 podría estar involucrado en la patogénesis de la EA. Se ha descrito que péptidos derivados de la moléculas B27 podrían ser presentados por moléculas HLA clase II (HLA-DR, -DQ y -DP) y ser reconocidos como auto-antígenos por linfocitos CD4 que hubiesen sido previamente activados por antígenos (Boyle y col., 2001).

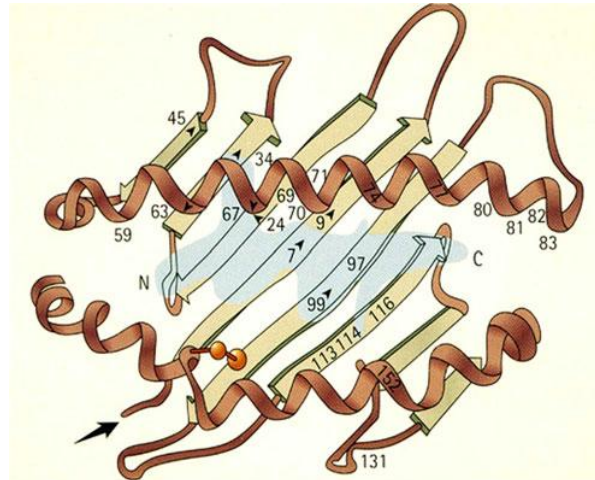
## **ANTECEDENTES**

El gen HLA-B27 presenta un alto grado de polimorfismo genético, con 105 subtipos conocidos, denominados HLA-B\*27:01 al HLA-B\*27:106, codificados por 132 alelos. La asignación del subtipo HLA-B\*27:22 fue revocada cuando se demostró que estaba basado en un error de secuencia. Diferentes estudios han demostrado una fuerte asociación entre la espondilitis anquilosante y formas relacionadas de espondiloartropatías con la presencia de HLA-B27, asociación que varía entre diferentes formas de espondiloartritis y grupos étnicos (Revisado en Muhammad, 2013). Los subtipos asociados con la predisposición a desarrollar espondilitis anquilosante son HLA-B\*27:05 (Caucásicos), HLA-B\*27:02 (poblaciones mediterráneas) y HLA-B\*27:04 (Chinos). En poblaciones chinas el HLA-B\*27:04 confiere un mayor riesgo a desarrollar espondilitis anquilosante que HLA-B\*27:05. Además, una asociación definitiva con la enfermedad o la ocurrencia de la

enfermedad, en al menos un paciente, se ha observado en individuos con subtipos HLA-B\*27:01, HLAB\*27:02, HLA-B\*27:03, HLA-B\*27:04, HLA-B\*27:05, HLA-B\*27:07, HLA-B\*27:08, HLA-B\*27:10, HLAB\*27:13, HLA-B\*27:14, HLA-B\*27:15, HLA-B\*27:19, HLA-B\*27:23, HLA-B\*27:24, HLA-B\*27:25, y HLAB\* 27:49. Por otra parte los subtipos HLA-B\*27:06 y HLA-B\*27:09 no han sido asociado con la enfermedad (Revisado en Muhammad, 2013). En el sureste asiático el subtipo HLA-B\*27:06 parece ser “neutral para la enfermedad”, porque no predispone a espondilitis anquilosante ni previene su ocurrencia. Sin embargo, la espondilitis anquilosante puede observarse en individuos con esos subtipos “neutral para la enfermedad” cuando son coheredados con subtipos asociados con la enfermedad (por ejemplo HLA-B\*27:05), o presentan genes predisponentes de otras enfermedades o una comorbilidad (por ejemplo colitis) que pueden independientemente predisponer a espondilitis anquilosante, sin embargo, pocos casos han sido notificados (Revisado en Muhammad, 2013).

El subtipo HLA-B\*27:09 difiere del subtipo HLA-B\*27:05, asociado con la enfermedad, por una sustitución en el residuo 114, donde el ácido aspártico es reemplazado por histidina. Mientras que el subtipo HLA-B\*27:06 difiere de HLA-B\*27:04, el subtipo asociado a la enfermedad en Asia, por sustituciones de aminoácidos en los residuos 114 y 116: la histidina en la posición 114 es reemplazada por ácido aspártico y el ácido aspártico en la posición 116 por tirosina (Figura 8). Los sitios de las sustituciones, los cuales parecen estar asociados con riesgo alterado a la enfermedad, están localizados en bolsillos específicos de la hendidura de unión del péptido, afectado la especificidad de unión del antígeno (Khan y Ball., 2002; Khan., 2010).

Finalmente, un individuo al heredar de cada padre un subtipo asociado con la enfermedad, por ejemplo HLA-B27 homocigoto, triplica el riesgo de desarrollar la patología, pero sin afectar las manifestaciones clínicas de la misma (Muhammad., 2013).



**Figura 8. Diagrama esquemático de la hendidura de unión del péptido de la molécula HLA-B27 con un péptido unido (azul claro).** Las letras N y C indican, respectivamente, el extremo amino y carboxilo terminal del péptido. HLA-B\*27:06, uno de los subtipos que al parecer no está asociado con espondilitis anquilosante y el subtipo HLA-B\*27:04, asociado con la enfermedad, difieren en dos residuos localizados en las posiciones 114 y 116 (Tomado de: Muhammad., 2013).

La actividad de las células NK está definida por el balance entre señales activadoras e inhibitoras procedentes de sus receptores. Entre sus receptores, están los KIR, los cuales son únicos debido a su diversidad y capacidad de reconocer alotipos de antígeno de leucocito humano (HLA). Hasta el presente se han desarrollado pocos estudios experimentales que relacionan el papel de genes KIR en espondiloartropatías y su relación con HLA-B27. Sin embargo, el papel de los homodímeros de la cadena pesada de HLA-B27 y su posible reconocimiento por receptores KIR en la patogénesis de espondiloartritis ha sido estudiado. Además, se ha sugerido que las células NK y sus receptores pueden jugar un papel en el desarrollo de la espondilitis anquilosante (Revisado en: López-Larrea., 2009).

En la Tabla III se muestran algunos estudios de asociación de genes KIR con espondilitis anquilosante en distintas poblaciones, cuyo componente étnico puede determinar la asociación o no entre los genes KIR y el desarrollo de EA.

**Tabla III. Estudios poblacionales que muestran el papel de la variabilidad de los genes KIR en el desarrollo de espondilitis anquilosante (EA)**

<b>Gen</b>	<b>Población estudiada</b>	<b>Tamaño de la muestra</b>	<b>Asociación</b>	<b>Referencia</b>
<i>KIR3DS1</i>	Dos poblaciones caucásicas (España y Portugal)	España (71 pacientes con EA y 105 controles) Portugal (Azores) (55 pacientes con EA y 75 controles)	En ambas poblaciones el gen <i>3DS1</i> y el genotipo <i>3DS1/3DL1</i> están asociados positivamente con EA	López-Larrea y col., 2006
<i>KIR3DL1/3DS1</i>	Dos poblaciones asiáticas (China y Tailandia)	China (42 pacientes con EA y 30 controles) Tailandia (30 pacientes con EA y 16 controles)	En ambas poblaciones se encontró en pacientes una frecuencia disminuida del genotipo <i>3DL1/3DL1</i> y una frecuencia incrementada del genotipo <i>3DL1/3DS1</i>	Díaz-Peña y col., 2008
Genes <i>KIR</i>	Población asiática (China)	119 pacientes con EA y 128 controles	Se observó una frecuencia incrementada de los genes <i>KIR3DS1</i> y <i>KIR2DL5</i> en pacientes	Jiao y col. 2008
14 genes <i>KIR</i>	Población caucásica (Reino Unido)	200 pacientes con EA y 405 controles	No se observó asociación de los genes <i>KIR3DL1</i> y <i>KIR3DS1</i> con EA	Harvey y col., 2009
<i>KIR2DL1/2DS1</i> , <i>KIR2DL2/2DL3</i> , <i>KIR3DL1</i> <i>KIR2DS4</i>	Población asiática (Irán)	40 pacientes con EA y 40 controles	No se observó asociación de genes <i>KIR</i> con EA	Mousavi y col., 2010
<i>KIR2DL5A</i> , <i>KIR2DS1</i> <i>KIR3DS1</i>	Población asiática (Irán)	35 pacientes con EA y 200 controles	Se halló una frecuencia incrementada de los genes <i>KIR2DL5</i> , <i>KIR2DS1</i> y <i>KIR3DS1</i> en pacientes	Nader y col., 2011

Gen	Población estudiada	Tamaño de la muestra	Asociación	Referencia
Genes <i>KIR</i>	Población asiática (China)	60 pacientes con EA y 60 controles	Se observó una frecuencia incrementada del gen <i>KIR3DS1</i> y del genotipo <i>KIR3DL1/3DS1/KIR2DL5</i> en pacientes	Fan y col., 2014
Genes <i>KIR</i>	Meta análisis	1004 pacientes con EA y 2138 controles	Los genes <i>KIR2DL1</i> , <i>KIR2DS4</i> , <i>KIR2DS5</i> incrementan la susceptibilidad a EA	Zuo y col., 2014
Genes <i>KIR</i>	Población española	176 pacientes con EA y 435 controles sanos	Se observó una frecuencia incrementada de los genes <i>KIR2DS1</i> y <i>KIR3DS1</i> y de los genotipos activadores en los pacientes.	Díaz-Peña y col., 2015

### HIPÓTESIS DE TRABAJO

Fundamentados en que la asociación de HLA–B27 con el desarrollo de la espondilitis anquilosante es una de las más fuertes, entre una molécula del complejo principal de histocompatibilidad y una enfermedad, y que diferentes estudios han propuesto un modelo en el cual los receptores KIR en sinergia con las moléculas HLA generan genotipos compuestos que proporcionan diferentes niveles de activación e inhibición de las células NK o T, planteamos la siguiente hipótesis:

Si los receptores KIR (*KIR3DL1* y *KIR3S1*) reconocen moléculas HLA-B27 no canónicas favoreciendo el desarrollo de espondilitis anquilosante, entonces la frecuencia de estos genes KIR estará alterada en pacientes con espondilitis anquilosante HLA-B27 positivos.

## **OBJETIVOS**

Considerando que diferentes estudios han mostrado que la molécula HLA-B27 y los receptores KIR contribuyen en la susceptibilidad a desarrollar espondilitis anquilosante, nos planteamos los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia del alelo *HLA-B27* y de los genes de receptores KIR (*KIR3DL1*, *KIR3DS1* y *KIR3DL2*) en pacientes con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Determinar la presencia del alelo *HLA-B27* en pacientes con diagnóstico presuntivo de EA.
- 2.- Determinar la presencia de los genes *KIR3DL1*, *KIR3DS1* y *KIR3DL2* en pacientes con diagnóstico presuntivo de EA.
- 3.- Comparar la frecuencia de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1* entre pacientes con o sin el alelo *HLA-B27*.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Selección de pacientes con Espondilitis Anquilosante (EA)**

Se estudiaron 96 individuos venezolanos, no relacionados y con diagnóstico clínico presuntivo de espondilitis Anquilosante (dolor lumbar o lumbago, principalmente), quienes acudieron al Servicio de Histocompatibilidad de la Sección Inmunogenética, Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), entre enero 2013 y octubre 2014, para la determinación molecular del alelo *HLA-B27*. Los pacientes fueron remitidos de distintas instituciones de salud, tanto públicas como privadas. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (Anexo 1)

### **2. Extracción de ADN Genómico**

El ADN genómico se obtuvo a partir de 5 mL de sangre periférica utilizando EDTA como anticoagulante y fue extraído por el Lic. Omar Balbás empleando el método con solvente orgánico (Bunce., 2000). El procedimiento es el siguiente:

La muestra de sangre periférica con anticoagulante se centrifuga por 10 minutos a 1000 g para obtener los leucocitos (capa blanca), estos son lavados con 10 mL de buffer de lisis de células rojas (RCLB: Red Cell Lysing Buffer), se agita por inversión. Luego se centrifuga de nuevo por 10 minutos a 1000 g, se descarta el sobrenadante y se repite el lavado con RCLB hasta que el precipitado de leucocitos quede blanco.

El precipitado se resuspende en 3 mL de buffer de lisis nuclear (NLB: Nuclear Lysing Buffer) y se deja en baño a 56 °C hasta que se disuelva el precipitado. Una vez disuelto, se añade 1 mL de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agita en vórtex, se añade 2 mL de cloroformo, se vuelve agitar hasta formar una solución lechosa, se centrifuga por 20 minutos a 1000 g. Luego con una pipeta de polipropileno se aspira el ADN (fase acuosa) y se transfiere a un tubo de polipropileno de 50 mL.

A la fase acuosa se le añade 2 volúmenes de etanol 95% frío, se rota el tubo hasta que el ADN precipite, se atrapa la malla de ADN con una pipeta de polipropileno y se traspasa

a un tubo de 1,5 mL estéril. El ADN se lava con etanol 70% y se centrifuga por 5 minutos a máxima velocidad, se retira el etanol. Finalmente, se resuspende el ADN en buffer TE 1X.

### **3. Ajuste de la concentración de ADN.**

La concentración de ADN se estimó por lectura de la densidad óptica (DO), midiendo la absorbancia a 260nm y a 280nm de cada muestra (2 µl) utilizando un nanodrop (NanoDrop™ 2000).

La concentración del ADN (µg/mL) viene dada por la fórmula:

[ADN] doble cadena = 50 µg /mL (factor constante) × DO 260nm.

1DO260nm = 50 µg de ADN/mL

Se calculó el índice = DO260nm / DO280nm (Este debe ser mayor de 1,7) y se ajustó la concentración de [ADN] a 200 µg/mL.

### **4. Integridad del ADN.**

Luego del ajuste, la integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% en TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) para luego de la corrida ser visualizados con luz ultravioleta en un transiluminador. En cada pozo se colocaron 2 µl de buffer de carga mezclado con 5 µl de ADN cuya concentración fue previamente ajustada a 200 µg/mL. En uno de los pozos del gel se colocó como control 5µl (200 µg/mL) del fago lambda (Promega) sin digerir. Se dejó correr a 100 voltios por media hora.

### **5. Métodos para el análisis de los polimorfismos**

Para el análisis de los genes estudiados se utilizó la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica fue descrita en 1983 por Kary Mullis (Revisado en: Mullis y Faloona, 1987).

El principio básico de la PCR es el incremento exponencial de la secuencia específica de ADN utilizando iniciadores oligonucleotídicos, cuyas secuencias

corresponden con la secuencia blanco y delimitan el segmento de ADN a amplificar (Revisado en: Mullis y Faloona, 1987).

Para la determinación del alelo *HLA-B27* y de los genes *KIR* (*KIR3DL1*, *KIR3DS1* y *KIR3DL2*) se utilizó la técnica PCR-SSP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Iniciadores de Secuencias Específicas), la cual permite identificar el polimorfismo directamente, utilizando iniciadores específicos durante el proceso de PCR (Shyamala y Ames, 1993).

### **5.1 PCR-SSP para la determinación del alelo *HLA-B27***

Para detectar la presencia o ausencia del alelo *HLA-B27* se utilizó el método PCR múltiplex, empleando el protocolo y los iniciadores específicos para *HLA-B27* publicados por Vanvi y colaboradores (Vanvi y col., 2011) (Tabla 4). Como controles internos de la PCR se utilizaron los iniciadores del grupo sanguíneo ABO descrito por Olsson (Olsson y col., 1998) (Tabla IV).

La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystem empleando la siguiente mezcla de reacción: PCR Buffer 1X, 0.5 pmol/μl de cada uno de los iniciadores *HLA-B27* (Forward, Reverse 1 y Reverse 2), 0.5 pmol/μl de los iniciadores ABO (Forward y Reverse), 0.08 mM de dNTPs, 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U/μl de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen), 1 μl de muestra de ADN genómico (50-100 ng) y agua destilada hasta completar un volumen final de 10 μl. En todas las reacciones se incluyó dos controles, un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) y un control positivo (mezcla de reacción con ADN de un individuo *HLA-B27* positivo).

**Tabla IV. Secuencia de los iniciadores utilizados para la detección del alelo *HLA-B27*.** Se indica la secuencia de los iniciadores y el tamaño del producto amplificado correspondiente, así como la secuencia de los iniciadores *ABO* como control positivo de la reacción.

<b>Gen</b>	<b>Secuencia de los iniciadores</b>	<b>Tamaño del producto amplificado</b>
<b><i>HLA-B27</i></b>	Primer Forward: 5'-GCTACGTGGACGACACGCT-3' Primer Reverse 1: 5'-CTCGGTCAGTCTGTGCCTT-3' Primer Reverse 2: 5'-TCTCGGTAAGTCTGTGCCTT-3'	149 pb
<b><i>ABO</i></b>	ABO-516 Forward: 5'-GCTGGAGGTGCGCGCCTAC-3' ABO-926 Reverse: 5'-ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTCTCGTC-3'	419 pb

La condición de la PCR fue la siguiente: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 65°C por 2 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto. Culminado el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final fue a 72°C por 10 minutos.

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 2 %, coloreado con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 45 min a 100 voltios. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen)

## 5.2 PCR-SSP para la determinación de los genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1*

Para detectar la presencia o ausencia del gen *KIR3DL1* responsable de señales inhibitoras y del gen *KIR3DS1* responsable de señales activadoras se utilizaron los iniciadores y el protocolo descrito por Zhuang y colaboradores (Zhuang y col., 2012) (Tabla V). Como controles internos de la PCR se utilizaron los iniciadores del grupo sanguíneo ABO descrito por Olsson y colaboradores (Olsson y col., 1998).

La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystem empleando la siguiente mezcla de reacción: PCR Buffer 1X, 1 pmol/ $\mu$ l de cada uno de los iniciadores para cada gen *KIR* específico (Tabla V), 0.1 pmol/ $\mu$ l de los iniciadores ABO (Forward y Reverse), 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de KCl, 0.4 mM de Tris-HCl, 3.25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 U/ $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen), 2  $\mu$ l de muestra de ADN genómico (50-100 ng) y agua destilada para completar un volumen total de reacción de 20  $\mu$ l. En todas las reacciones se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) y un control positivo (mezcla de reacción con ADN de un individuo *KIRDL1/KIR3DS1* positivo).

La condición de la PCR fue la siguiente: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 90 segundos a 72°C. Finalmente, la extensión final fue de 10 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 1.5 %, coloreado con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 45 min a 100 voltios. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

**Tabla V. Secuencias de los iniciadores utilizadas para la determinación de genes *KIR3DL1* y *KIR3DS1*.** Se indica la secuencia de los iniciadores y el tamaño del producto amplificado correspondiente, así como la secuencia de los iniciadores *ABO* como control positivo de la reacción

Gen	Secuencia de los iniciadores	Tamaño del producto amplificado
<b><i>KIR3DL1</i></b>	Forward: 5'-AAGACACCCCTACAGATACCATCT-3' Reverse: 5'-GCAGGCAGTGGGGACCTTAGACA-3'	277 pb
<b><i>KIR3DS1</i></b>	Forward: 5'-CAGCGCTGTGGTGCCTCGC-3' Reverse: 5'-CTGTGACCATGATCACCAT-3'	249 pb
<b><i>ABO</i></b>	ABO-516 Forward: 5'-GCTGGAGGTGCGCGCCTAC-3' ABO-926 Reverse: 5'-ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTCTCGTC-3'	419 pb

### 5.3 PCR-SSP para la determinación de los genes *KIR3DL2*

Para detectar la presencia del gen estructural *KIR3DL2*, responsable de señales inhibitoras, se utilizaron los iniciadores y el protocolo descrito por Gómez-Lozano y colaboradores (Gómez-Lozano y col., 2002) (Tabla VI). Como controles internos de la PCR se utilizaron los iniciadores del grupo sanguíneo ABO descrito por Olsson y colaboradores (Olsson y col., 1998)

La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer empleando la siguiente mezcla de reacción: PCR Buffer 1X, 1 pmol/ $\mu$ l de cada uno de los iniciadores *KIR3DL2*, 0.1 pmol/ $\mu$ l de los iniciadores ABO (Forward y Reverse), 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de KCl, 0.4 mM de Tris-HCl, 3.25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 U/ $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen), 2  $\mu$ l de muestra de ADN genómico (50-100 ng) y agua destilada para completar un volumen

total de reacción de 20 µl. En todas las reacciones se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

La condición de la amplificación fue la siguiente: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min, seguido de 10 ciclos de 20 segundos a 94°C, 10 segundos a 65°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C (temperaturas de desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente), seguido por 20 ciclos de 20 segundos a 94°C, 10 segundos a 61°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C. Por último la extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 1.5 %, coloreado con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 45 min a 100 voltios. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen).

**Tabla VI. Secuencias de los iniciadores utilizadas para la determinación del gen *KIR3DL2*.**

Se indica la secuencia de los iniciadores y el tamaño del producto amplificado correspondiente, así como la secuencia de los iniciadores *ABO* como control positivo de la reacción

Gen	Secuencia de los iniciadores	Tamaño del producto amplificado
<b><i>KIR3DL2</i></b>	Forward: 5'- CGGTCCCTTGATGCCTGT -3' Reverse: 5'- GACCACACGCAGGGCAG -3'	1948 pb
<b><i>ABO</i></b>	ABO-516 Forward: 5'-GCTGGAGGTGCGCCTAC-3' ABO-926 Reverse: 5'-ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTCTCGTC-3'	419 pb

## 6. Análisis estadístico

La frecuencia del alelo *HLA-B27* y de los genes *KIR* (*KIR3DL1* y *KIR3DS1*) se determinó por contaje directo. La significancia estadística de las diferencias de frecuencias (gen, combinación de genes) entre los grupos [Pacientes EA vs. Control; Pacientes *HLA-B27* positivo vs. Pacientes *HLA-B27* negativo, Pacientes *HLA-B27* positivo vs. Control; Pacientes *HLA-B27* negativo vs. Control] se estimó por la prueba de ji cuadrado ( $\chi^2$ ) Mantel-Haenszel usando tablas de contingencia 2x2 (Tabla VII). Los valores de (p) se corrigieron multiplicándolos por el número de comparaciones hechas (corrección de Bonferroni) (Svejgaard y Ryder., 1994) y se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad (p) era menor de 0,05.

**Tabla VII. Tabla de contingencia 2x2**

	<i>KIR3D</i> presente	<i>KIR3D</i> ausente	Total
<i>B27</i> positivo	A	b	a + b
<i>B27</i> negativo	C	d	c + d
Total	a + c	c + d	

Donde:

a= número de pacientes con el alelo *B27* (*B27* positivo) y con el gen *KIR3D* (*S1* o *L1*)

b= número de pacientes *B27* positivo y sin el gen *KIR3D* (*S1* o *L1*)

c= número de pacientes sin el alelo *B27* (*B27* negativo) y con el gen *KIR3D* (*S1* o *L1*)

d= número de pacientes *B27* negativo y sin el gen *KIR3D* (*S1* o *L1*)

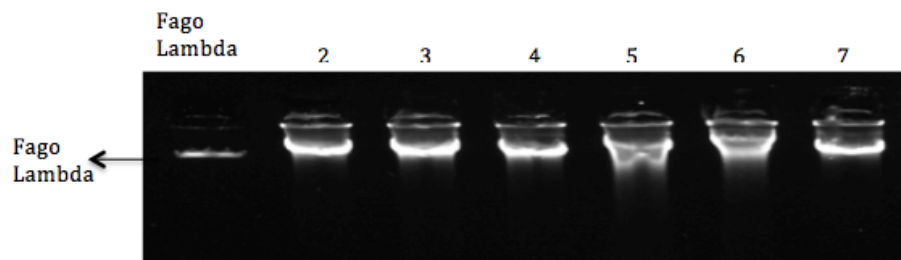
## RESULTADOS

### 1. Características del grupo de pacientes

Se estudiaron en total 96 individuos relacionados y con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante, 48 individuos eran de sexo masculino (50%) y 48 de sexo femenino (50%). Estos individuos acudieron al servicio de Histocompatibilidad de la sección de Inmunogenética, del Laboratorio de Fisiopatología, del Centro de Medicina Experimental-IVIC, para la determinación del alelo *HLA-B27* como marcador diagnóstico de EA.

### 2. Calidad del ADN

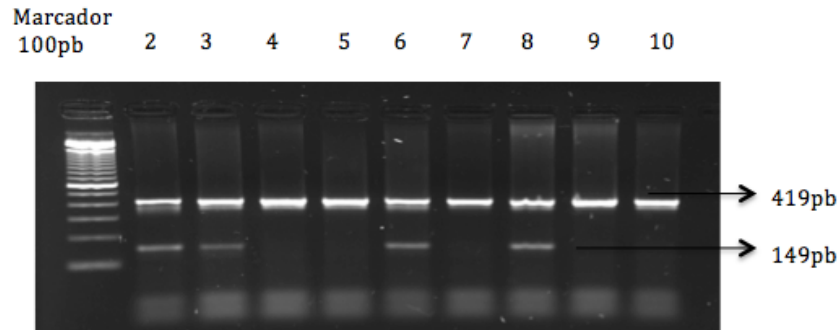
Una vez ajustada la concentración del ADN a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se visualizó en geles de agarosa al 0,75% y se utilizó bromuro de etidio para la detección del ADN en el gel. Esto nos permitió confirmar si el ADN estaba ajustado a la concentración deseada al compararlo con un patrón ajustado a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fago Lambda). Además, nos permitió evidenciar que el ADN genómico obtenido de las muestras de sangre periférica no estaba degradado (Figura 9).



**Figura 9. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X.** Observamos el ADN genómico (bolsillos 2 al 7) correspondientes a muestras de ADN de individuos incluidos en el estudio, así como el fago lambda ajustado a 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (marcador de referencia).

### 3. Determinación del alelo *HLA-B27*

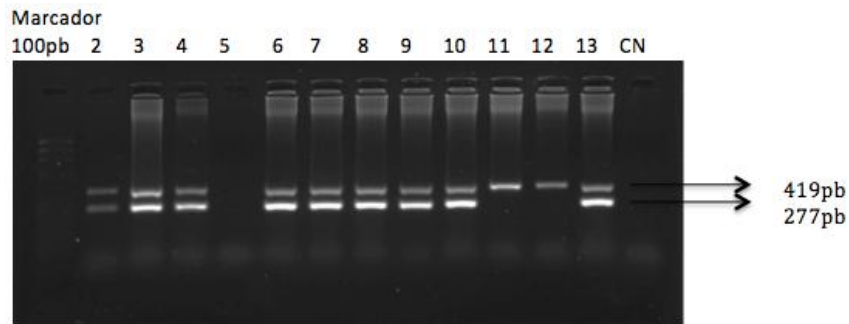
En la Figura 10 se muestra el producto amplificado correspondiente al alelo *HLA-B27* (149 pb) y al control interno *ABO* (419 pb)



**Figura 10: Producto amplificado correspondiente al alelo *HLA-B27* visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X:** Se observa el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los bolsillos 2, 3, 6 y 8 corresponden a muestras de individuos que poseen el alelo *HLA-B27* (*B27* positivo: 149 pb), los bolsillos 4,5, 7, 9 y 10 corresponden a muestras de individuos que no poseen el alelo *HLA-B27* (*B27* negativo). En todos los bolsillos se observa presencia del control interno (*ABO*: 419 pb).

### 4. Determinación del gen *KIR3DL1*

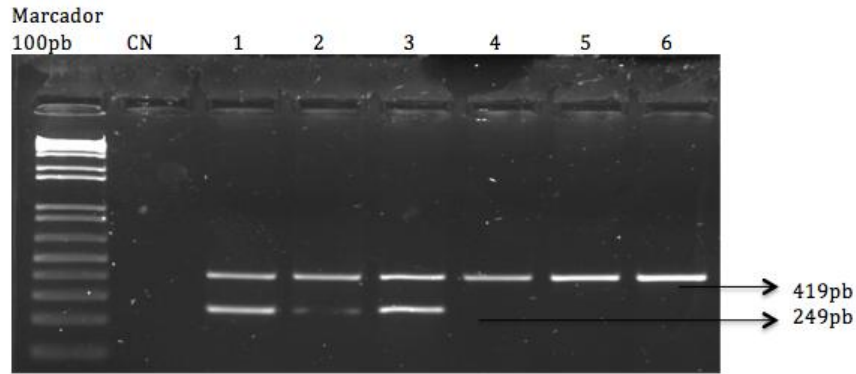
En la Figura 11 se muestra el producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DL1* (277 pb) y al control interno *ABO* (419 pb)



**Figura 11: Producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DL1* visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X:** Se observa el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los bolsillos del 2 al 4, 6 al 10 y 13 corresponden a muestras de individuos que poseen el gen *KIR3DL1* (277 pb), los bolsillos 11 y 12 corresponden a muestras de individuos que no poseen el gen *KIR3DL1*. El bolsillo 5 no posee ninguna banda, por lo tanto, en casos como ese se repitió el protocolo modificando la concentración del ADN. En todos los bolsillos se observa presencia del control interno (*ABO*: 419 pb). CN: control negativo

### 5. Determinación del gen *KIR3DS1*

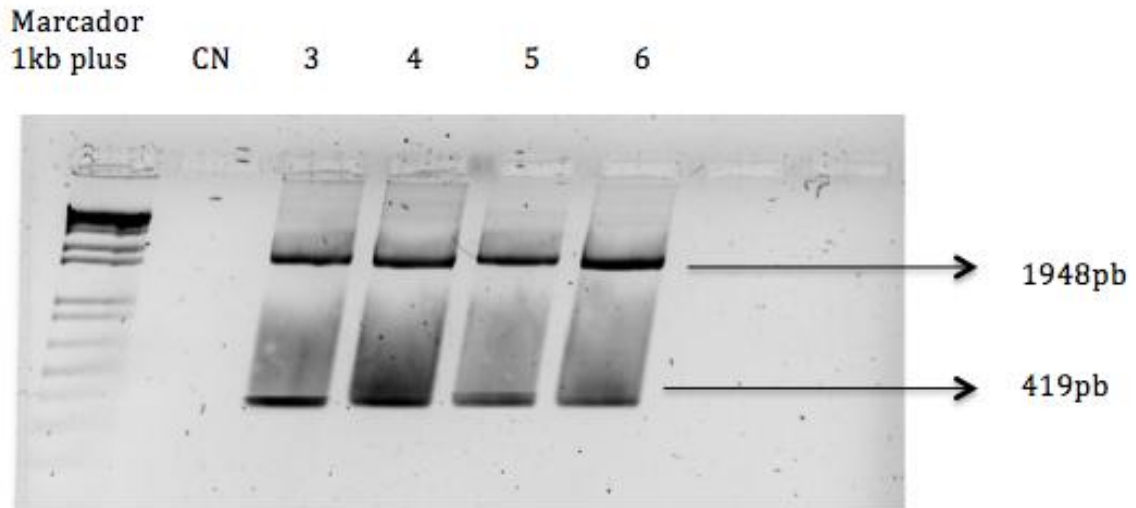
En la Figura 12 se muestra el producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DS1* (249 pb) y al del control interno *ABO* (419 pb)



**Figura 12: Producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DS1* visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X:** Se observa el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los bolsillos del 1 al 3 corresponden a muestras de individuos que poseen el gen *KIR3DS1* (249 pb), los bolsillos 4 al 6 corresponden a muestras de individuos que no poseen el gen *KIR3DS1*. En todos los bolsillos se observa presencia del control interno (*ABO*: 419 pb). Control negativo (CN)

### 6. Determinación del gen *KIR3DL2*

La determinación del gen *KIR3DL2* fue realizada en únicamente un 13% de las muestras (n=12) por ser un gen estructural, el cual es expresado por todos los individuos independientemente del origen étnico. En la Figura 13 se muestra el producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DL2* (1948 pb) y al del control interno *ABO* (419 pb)



**Figura 13: Producto amplificado correspondiente al gen *KIR3DL2* visualizado en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio en buffer TE 1X:** Se observa el marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los bolsillos del 3 al 6 corresponden a muestras de individuos que poseen el gen *KIR3DL2* (1948 pb). En todos los bolsillos se observa presencia del control interno (*ABO*: 419 pb). Control negativo (CN) (bolsillo 2)

### **7. Distribución de la frecuencia del alelo *HLA-B27* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante**

Al determinar la presencia del alelo *HLA-B27* observamos que el 52% de los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante presentaban el alelo *HLA-B27* (*HLA-B27* positivo) y un 48% eran negativos para este alelo (*HLA-B27* negativo) (Tabla VIII)

**Tabla VIII. Distribución de la frecuencia del alelo *HLA-B27* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis Anquilosante**

<i>HLA-B27</i>	Pacientes con EA (n= 96)
<b>Positivo</b>	52 (50)
<b>Negativo</b>	48 (46)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del alelo. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**Positivo:** individuos con el alelo *HLA-B27*, **Negativo:** individuos sin el alelo *HLA-B27*.

**8. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DL1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis Anquilosante**

Al determinar la presencia del gen *KIR3DL1* observamos que el 71% de los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante presentaban el gen *KIR3DL1* y un 29% no presentaban este gen (Tabla IX)

**Tabla IX. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DL1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante.**

Gen <i>KIR3DL1</i>	Pacientes con EA (n= 96)
<b>Presencia</b>	71 (68)
<b>Ausencia</b>	29 (28)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del gen. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**Presencia:** individuos con el gen *KIR3DL1*, **Ausencia:** individuos sin el gen *KIR3DL1*.

### 9. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DS1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante

Al determinar la presencia del gen *KIR3DS1* observamos que el 36% de los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante presentaban el gen *KIR3DS1* y un 64% no presentaban este gen (Tabla X)

**Tabla X. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DS1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis Anquilosante**

Gen <i>KIR3DS1</i>	Pacientes con EA (n= 96)
Presencia	36 (35)
Ausencia	64 (61)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del gen. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**Presencia:** individuos con el gen *KIR3DS1*, **Ausencia:** individuos sin el gen *KIR3DS1*

### 10. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DL1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27*

Al agrupar los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante de acuerdo a la presencia o ausencia del alelo *HLA-B27*, observamos que entre los individuos *HLA-B27* positivos (n=50): 70% presentaban el gen *KIR3DL1* y 30% no presentaban este gen. En contraste, entre los individuos *HLA-B27* negativos (n=46): 72% presentaban el gen *KIR3DL1* y 28% no presentaban este gen. (Tabla XI).

**Tabla XI. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DL1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27***

	<b><i>HLA-B27</i> Positivo (n=50)</b>	<b><i>HLA-B27</i> Negativo (n=46)</b>
<b>Presencia <i>KIR3DL1</i></b>	70 (35)	72 (33)
<b>Ausencia <i>KIR3DL1</i></b>	30 (15)	28 (13)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del gen. La frecuencia está expresada en porcentajes.

**Presencia:** individuos con el gen *KIR3DL1*, **Ausencia:** individuos sin el gen *KIR3DL1*.

**11. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DS1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27***

Al agrupar a los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante de acuerdo a la presencia o ausencia del alelo *HLA-B27*, observamos que entre los individuos *HLA-B27* positivos (n=50): 34% presentaban el gen *KIR3DS1* y 66% no presentaban este gen. En contraste, entre los individuos *HLA-B27* negativos (n=46): 39% presentaban el gen *KIR3DS1* y 61% no presentaban este gen. (Tabla XII).

**Tabla XII. Distribución de la frecuencia del gen *KIR3DS1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27***

	<i>HLA-B27</i> Positivo (n=50)	<i>HLA-B27</i> Negativo (n=46)
<b>Presencia <i>KIR3DS1</i></b>	34 (17)	39 (18)
<b>Ausencia <i>KIR3DS1</i></b>	66 (33)	61 (28)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del gen. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**Presencia:** individuos con el gen *KIR3DS1*, **Ausencia:** individuos sin el gen *KIR3DS1*.

**12. Distribución de la frecuencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante**

Al determinar la presencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* observamos que el 44% de los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante presentaban la combinación génica ***KIR3DS1* Ausente/*KIR3DL1* Presente**, seguida por las combinaciones ***KIR3DS1* Presente/*KIR3DL1* Presente (27 %)**, ***KIR3DS1* Ausente/*KIR3DL1* Ausente (22 %)** y ***KIR3DS1* Presente/*KIR3DL1* Ausente (9%)** (Tabla XIII)

**Tabla XIII. Distribución de combinaciones génicas en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante**

<b>Combinación génica <i>KIR3DL1/KIR3DS1</i></b>	<b>Pacientes con EA (n=96)</b>
<b><i>KIR3DS1</i> Presente/ <i>KIR3DL1</i> Presente</b>	27 (26)
<b><i>KIR3DS1</i> Ausente/<i>KIR3DL1</i> Presente</b>	44 (42)
<b><i>KIR3DS1</i> Presente/ <i>KIR3DL1</i> Ausente</b>	9 (9)
<b><i>KIR3DS1</i> Ausente/ <i>KIR3DL1</i> Ausente</b>	20 (19)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores de la combinación génica. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**13. Distribución de la frecuencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante y *HLA-B27* positivo**

Al determinar la presencia de *las combinaciones génicas KIR3DL1/KIR3DS1* entre los individuos *HLA-B27* positivo, observamos que el 44% de los pacientes con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante presentaban la combinación génica ***KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Presente***, seguida por las combinaciones ***KIR3DS1 Presente/KIR3DL1 Presente*** (22 %), ***KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Ausente*** (18 %) y ***KIR3DS1 Presente/KIR3DL1 Ausente*** (12 %) (Tabla XIV)

**Tabla XIV. Distribución de combinaciones génicas individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante y HLA-B27 positivo**

<b>Combinación génica</b>	<b>Pacientes con EA HLA-B27 positivo (n=50)</b>
<b><i>KIR3DS1</i> Presente/ <i>KIR3DL1</i> Presente</b>	22 (11)
<b><i>KIR3DS1</i> Ausente/<i>KIR3DL1</i> Presente</b>	44 (24)
<b><i>KIR3DS1</i> Presente/ <i>KIR3DL1</i> Ausente</b>	12 (6)
<b><i>KIR3DS1</i> Ausente/ <i>KIR3DL1</i> Ausente</b>	18 (9)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores de la combinación génica. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**14. Distribución de la frecuencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* en individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante y HLA-B27 negativo**

Al determinar la presencia de *las combinaciones génicas KIR3DL1/KIR3DS1* entre los individuos HLA-B27 negativo, observamos que el 39 % de los pacientes con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante presentaban la combinación génica ***KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Presente***, seguida por las combinaciones ***KIR3DS1 Presente/ KIR3DL1 Presente*** (33 %), ***KIR3DS1 Ausente/ KIR3DL1 Ausente*** (22 %) y ***KIR3DS1 Presente/ KIR3DL1 Ausente*** (6 %) (Tabla XV)

**Tabla XV. Distribución de combinaciones génicas individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante y HLA-B27 negativo**

Combinación génica	Pacientes con EA HLA-B27 negativo (n=46)
<i>KIR3DS1</i> Presente/ <i>KIR3DL1</i> Presente	33 (15)
<i>KIR3DS1</i> Ausente/ <i>KIR3DL1</i> Presente	39 (18)
<i>KIR3DS1</i> Presente/ <i>KIR3DL1</i> Ausente	6 (3)
<i>KIR3DS1</i> Ausente/ <i>KIR3DL1</i> Ausente	22 (10)

**NOTA.** Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores de la combinación génica. La frecuencia está expresada en porcentaje.

**15. Comparación de la frecuencia del gen *KIR3DL1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27***

Al comparar la frecuencia del gen *KIR3DL1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante *HLA-B27* positivo y *HLA-B27* negativo, no observamos una diferencia significativa en la frecuencia del gen *KIR3DL1* entre estos individuos (35 individuos *B27* positivo vs. 33 individuos *B27* negativo,  $\chi^2$ : 0.034,  $p=0.426$ ) (Tabla XVI)

**Tabla XVI. Comparación de la frecuencia del gen *KIR3DL1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo**

<i>KIR3DL1</i>	<i>HLA-B27</i>		$\chi^2$	$p$
	<i>HLA-B27</i> Positivo (n=50)	<i>HLA-B27</i> negativo (n=46)		
Presente	35	33	0.034	0.426

$\chi^2$ : ji cuadrado Mantel-Haenszel,  $p$ : probabilidad,  $p$  significativo <0.05

**16. Comparación de la frecuencia del gen *KIR3DS1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27***

Al comparar la frecuencia del gen *KIR3DS1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante *HLA-B27* positivo y *HLA-B27* negativo, no observamos una diferencia significativa en la frecuencia del gen *KIR3DS1* entre estos individuos (17 individuos *B27* positivo vs. 18 individuos *B27* negativo,  $\chi^2$ : 0.269,  $p=0.302$ ) (Tabla XVII)

**Tabla XVII. Comparación de la frecuencia del gen *KIR3DS1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27***

<i>KIR3DS1</i>	<i>HLA-B27</i> Positivo (n=50)	<i>HLA-B27</i> negativo (n=46)	$\chi^2$	<i>P</i>
Presente	17	18	0.269	0.302

$\chi^2$ : ji cuadrado Mantel-Haenszel,  $p$ : probabilidad,  $p$  significativo <0.05

**17. Comparación de la frecuencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27***

Al comparar la frecuencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante *HLA-B27* positivo y *HLA-B27* negativo, no observamos diferencias significativas en la frecuencia de estas combinaciones entre estos individuos (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Comparación de la frecuencia de las combinaciones génicas *KIR3DL1/KIR3DS1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante clasificados de acuerdo al alelo *HLA-B27*

Combinación génica	<i>HLA-B27</i> positivos (n=50)	<i>HLA-B27</i> negativos (n=46)	$\chi^2$	<i>p</i>
<i>KIR3DS1</i> Presente/ <i>KIR3DL1</i> Presente	11	15	1.35	0.122
<i>KIR3DS1</i> Ausente/ <i>KIR3DL1</i> Presente	24	18	0.75	0.192
<i>KIR3DS1</i> Presente/ <i>KIR3DL1</i> Ausente	6	3	0.83	0.180
<i>KIR3DS1</i> Ausente/ <i>KIR3DL1</i> Ausente	9	10	0.20	0.790

$\chi^2$ : ji cuadrado Mantel-Haenszel, *p*: probabilidad, *p* significativo <0.05

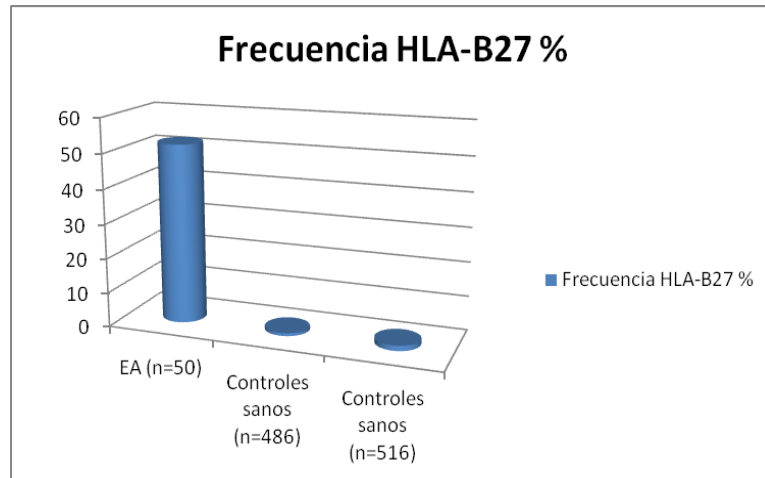
## DISCUSION

La espondilitis anquilosante es una enfermedad crónica inflamatoria que normalmente afecta la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas (Lories y Luyten., 2009). En la etiología de esta enfermedad juega un papel importante el componente génico, que en esta patología se especula que es oligogénico, es decir es producida por uno o sólo unos pocos genes, jugando un papel importante el antígeno leucocitario humano (HLA)-B27. (Revisado Zvyagin y col., 2010).

### **1. Distribución de frecuencia del alelo HLA-B27**

La frecuencia de HLA-B27 varía de un 88 a más de un 90% entre pacientes con EA comparado a un 4–8% en controles. Sin embargo, distintos grupos étnicos muestran diferentes frecuencias de HLA-B27 entre pacientes con EA. Por ejemplo, en la población Hindú la frecuencia de HLA-B27 entre pacientes con EA u otras espondiloartropatías es de 30-94% comparada a la frecuencia observada en la población general (1.4–8%) (Devraj y col., 2014). En nuestro estudio observamos que la frecuencia del alelo *HLA-B27* entre individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante fue de un 52% comparado al 0.86-1.5% observado en la población general venezolana (Fortes y col., 2012, datos sin publicar de la Sección Inmunogenética, Laboratorio de Fisiopatología, CME-IVIC, respectivamente) (Figura 14).

Se ha confirmado que el alelo *HLA-B27* es un factor que confiere riesgo a desarrollar EA en la población venezolana, acorde a lo descrito en otras poblaciones (Muhammad, 2013). Sin embargo, en nuestro estudio observamos que un 48% de los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante no presentaban el alelo *HLA-B27*, sugiriendo que otros alelos HLA-B son los que posiblemente están confiriendo susceptibilidad al desarrollo de EA. Esto concuerda con lo descrito en otras poblaciones, donde se ha demostrado que otros alelos HLA-B están asociados con espondiloartropatías seronegativas (Khan y col. 1978 (a); Khan y col., 1978 (b); Khan y col., 1983; Robinson y col., 1989; Yamaguchi y col., 1995 Sampaio-Barros y col., 2003; Wei y col., 2004; Devraj y col., 2009).



**Figura 14. Distribución de la frecuencia del alelo *HLA-B27* en individuos con diagnóstico presuntivo de EA y población general venezolana**

En pacientes caucásicos, japoneses y alemanes que son HLA-B27 negativo, la susceptibilidad a desarrollar EA está determinada por los alelos HLA-B16 (actualmente, B38 y B39) y HLA-B35CREG (B18, B35, B51, y B62) (Wagener y col. 1983; van der Linden y col., 1984; Yamaguchi y col., 1995). Además, se ha descrito que individuos con hallazgos clínicos y radiológicos característicos de EA, pero HLA-B27 negativo pueden desarrollar espondiloartropatías seronegativas (Devraj y col., 2014). Por otra parte, cabe destacar que estudios realizados en gemelos monocigóticos muestran que el HLA-B27 contribuye con sólo un 16% del riesgo genético total, sugiriendo que en la EA están involucrados otros genes (Zvyagin y col., 2010). Por lo tanto, descifrar los factores hereditarios que contribuyen a la EA es importante en la comprensión de los mecanismos de iniciación y la progresión de la enfermedad (Zvyagin y col., 2010).

Varios genes han sido asociados con el desarrollo de EA, incluyendo los genes no HLA, entre los cuales destacan los genes KIR. Estos genes codifican receptores de tipo inmunoglobulina (KIR) que se expresan en las células citotóxicas naturales (NK) y en un subconjunto de células T (Majorczyk y col., 2007). En las células NK, los KIR juegan un papel clave en el balance de señales activadoras e inhibitoras que determinan la respuesta de la célula NK, permitiéndole a la célula NK escanear la presencia de complejos MHC clase I:péptido antigénico en la célula blanco (Zvyagin y col., 2010).

Aunque el papel de los KIR expresados en sub-poblaciones de células T es menos claro, la interacción KIR–MHC clase I puede inhibir la actividad citolítica y la producción de citoquinas de estas células, pero el nivel de inhibición de las funciones efectoras de la célula T mediada por los receptores KIR va depender de la fuerza de estimulación del receptor de antígeno de la célula T (TCR). Por lo tanto, en relación con el papel de KIR en células NK, los KIR probablemente regulan la activación y la inhibición de esta sub-población de células T específica (Zvyagin y col., 2010). Hasta el presente se han desarrollado pocos estudios experimentales que relacionan el papel de genes KIR en el desarrollo de espondiloartropatías y su relación con HLA-B27. Sin embargo, el papel de los homodímeros de la cadena pesada de HLA-B27 y su posible reconocimiento por receptores KIR en la patogénesis de espondiloartritis ha sido estudiado.

## **2. Distribución de frecuencia de los genes KIR3D**

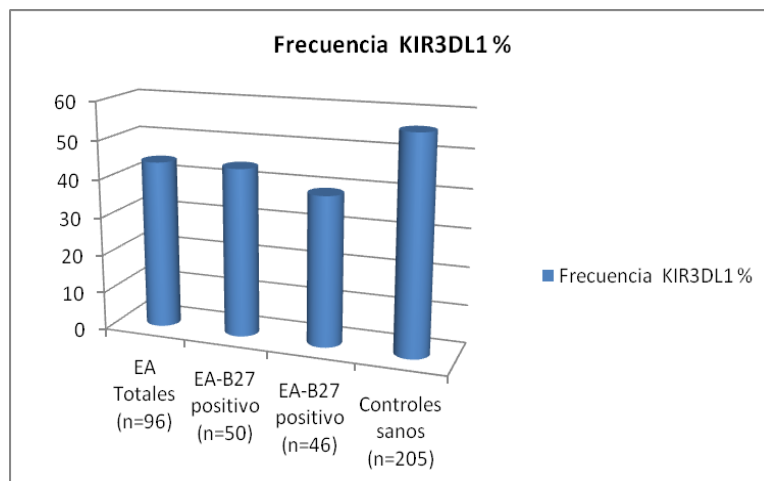
### **a. Genes KIR3D inhibidores (3DL2 y 3DL1)**

Entre los genes *KIR*, el gen *KIR3DL1* es de particular interés en la espondilitis anquilosante. El receptor *KIR3DL1* es el único que reconoce moléculas HLA-B del serotipo Bw4 [variante definida por la presencia en el residuo 80 de una isoleucina (Ile80) o una treonina (Thr80)], entre ellas el antígeno HLA-B27. *KIR3DL1* es un receptor inhibitorio que interactúa con HLA-Bw4 para suprimir la actividad citolítica de las células NK y T, y probablemente juega un papel importante contra autoinmunidad. Además, *KIR3DL1* junto *KIR3DL2* reconocen homodímeros de cadenas alfa de la molécula HLA-B27 expresados en la superficie celular. Dichos homodímeros han sido asociados con el desarrollo de EA (Hipótesis de la expresión de cadenas aberrantes en la superficie celular) (Colbert y col., 2014)

Considerando que el gen *KIR3DL2* se ha descrito en todas las poblaciones a nivel mundial, incluyendo la población venezolana (Conesa y col., 2010), como un gen estructural o framework presente en todos los haplotipos (Bashirova y col, 2007), realizamos la determinación del mismo en sólo un 13% de las muestras (n=12), siendo todas positivas para *KIR3DL2* (100%). Por lo tanto, en relación a este gen no se realizaron

comparaciones de frecuencias entre grupos (EA vs. control, EA-B27 positivo vs. EA-B27 negativo, etc.)

Con respecto al gen *KIR3DL1*, observamos en los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante (independientemente de la presencia o ausencia del alelo *HLA-B27*) una menor frecuencia del mismo en comparación a la frecuencia descrita en población sana venezolana (Conesa y col., 2010) [71% en EA vs. 97% en controles;  $\chi^2= 18.37$ ;  $p= 0.000009$ ], [70% en individuos con EA-B27 positivo vs. 97% en controles;  $\chi^2= 13.85$ ;  $p= 0.00009$ ] y [72% en individuos con EA-B27 negativo vs. 97% en controles;  $\chi^2= 11.22$ ;  $p= 0.0004$ ] (Figura 15). Estos resultados concuerdan con lo descrito en poblaciones caucásicas, de España y Portugal (López-Larrea y col., 2006), y poblaciones asiáticas, de China y Tailandia (Díaz-Peña y col., 2008), en las cuales la frecuencia del gen *KIR3DL1* estaba disminuida en pacientes con EA (*HLA-B27* positivo) con respecto a controles (*HLA-B27* positivo).



**Figura 15. Distribución de frecuencia del gen *KIR3DL1* entre individuos con diagnóstico presuntivo de EA y población general venezolana**

Como se había descrito previamente, los receptores *KIR3DL1* y *KIR3DL2* son capaces de reconocer y unir dímeros de cadenas alfa de *HLA-B27*, expresadas en la superficie celular (Kollnberger y col., 2002 y Kollnberger y col., 2004). Además, se ha

demostrado que KIR3DL1 reconoce moléculas HLA-B27 cargadas con péptidos propios, así como con péptidos virales. Sin embargo, algunos péptidos virales se unen a la molécula HLA-B \*2705, bloqueando la actividad del receptor inhibidor KIR3DL1 en las células NK (Stewart-Jones y col., 2005). Por lo tanto, la unión de la molécula HLA de la familia Bw4 al receptor KIR3DL1 va depender del péptido unido y de residuos claves de la cadena pesada ( $\alpha$ ) de la molécula HLA, específicamente la hélice  $\alpha$  del dominio 1 alrededor de Ile80 (Stewart-Jones y col., 2005). Stewart-Jones y colaboradores demostraron que el receptor KIR3DL1 no se une al complejo HLA-B \* 2705- EBV (EBNA3C 258–266: péptido RRIYDLIEL del virus Epstein-Barr), debido a la naturaleza de la cadena lateral del péptido (P8), ya que el reconocimiento se restaura si hay un cambio de ácido glutámico (P8E) por Treonina (P8E). Esta falla en el reconocimiento de la molécula HLA-B27 podría ser debido a un efecto directo de la cadena lateral P8E, o a una alteración indirecta de la estructura de HLA-B \*2705, o por una combinación de ambos. Consecuentemente, estos resultados sugieren un nuevo mecanismo por el cual los péptidos derivados de las infecciones microbianas podrían ser "artritogénicos", porque interfieren con el reconocimiento mediado por KIR3DL1, favoreciendo así la activación de las células NK. Así, sí durante la infección las moléculas HLA-B \* 2705 son cargadas con péptidos microbianos dominantes, éstas no podrán interactuar con el receptor inhibidor KIR3DL1, favoreciendo así un efecto pro-inflamatorio mediado por la activación incrementada de las células NK (Stewart-Jones y col., 2005).

En conclusión, aunque KIR3DL1 reconoce moléculas HLA-B27 canónicas (heterodímeros  $\alpha:\beta_2m$ ) y no canónicas (homodímeros  $\alpha:\alpha$ ), este receptor protege contra el desarrollo de EA porque es un receptor inhibidor que impide la activación de las células NK y posiblemente de las sub-poblaciones de células T, lo que explicaría su frecuencia incrementada en controles versus individuos con EA. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza del péptido unido a la molécula HLA-B27 se puede afectar la interacción del receptor KIR3DL1 con su ligando HLA-B27 favoreciendo así la activación de las células NK y sub-poblaciones de células T y el desarrollo de inflamación (EA).

Finalmente, al comparar la frecuencia del gen *KIR3DL1* entre pacientes con diagnóstico presuntivo de EA, agrupados de acuerdo al alelo *HLA-B27* (positivo vs. negativo), no observamos una diferencia significativa, sugiriendo que el papel protector de *KIR3DL1* es independiente de la ausencia del alelo *HLA-B27*.

**b. Gen *KIR3D activador (3DS1)***

En relación a la contraparte del receptor *KIR3DL1*, es decir el receptor *KIR3DS1*, es un receptor activador cuyo ligando no ha sido identificado, pero se especula que interactúa con la molécula *HLA-Bw4*, de la misma manera que lo hace *KIR3DL1* (Zvyagin y col., 2010). En nuestro estudio observamos que la frecuencia del gen *KIR3DS1* en los individuos con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante (independientemente de la presencia o ausencia del alelo *HLA-B27*) es similar a la descrita en población venezolana (Conesa y col., 2010) [36% en EA vs. 44% en controles;  $\chi^2 = 1.48$ ;  $p = 0.11$ ] [34% en individuos con EA-*B27* positivo vs. 44% en controles;  $\chi^2 = 1.61$ ;  $p = 0.10$ ] [39% en individuos con EA-*B27* negativo vs. 44% en controles;  $\chi^2 = 0.34$ ;  $p = 0.27$ ]. Estos resultados concuerdan con lo descrito en población caucásica, de Reino Unido (Harvey y col., 2009), y población asiática, de Irán (Mousavi col., 2010), en las cuales el gen *KIR3DS1* no se asoció con el desarrollo de EA. Sin embargo, contrasta con lo descrito en poblaciones caucásicas, de España y Portugal (López-Larrea y col., 2006), y poblaciones asiáticas, de China (Jiao y col., 2008, Díaz-Peña y col., 2008, Fan y col., 2014) y Tailandia (Díaz-Peña y col., 2008), en las cuales la frecuencia del gen *KIR3DS1* estaba significativamente incrementada en pacientes con EA (*HLA-B27* positivo) con respecto a controles (*HLA-B27* positivo). Los resultados contradictorios pueden explicarse por los diferentes criterios de inclusión utilizados en cada estudio y a diferencias del fondo genético entre poblaciones (etnia). Cabe destacar, que sobre la base de los datos históricos, la población de Venezuela es el resultado de una mezcla multiétnica de aborígenes mongoloide primitivos, caucásicos europeos y negroides de África Occidental (Revisado: Quintero, 1967). Datos demográficos publicados muestran que en el año 1961 la población de Caracas era de 1.257.515 habitantes, de los cuales 178.750 eran inmigrantes. Este fuerte contingente

migratorio consistió en 78.926 españoles; 44.162 italianos; 22499 portugueses; 7.093 colombianos; 2.989 cubanos; 1.461 alemanes; 1465 franceses; 1.126 argentinos; 1.328 ecuatorianos; 1.305 libaneses; 1.461 sirios; 914 norteamericanos y 923 China [Revisado en Vila, 1978]. Constituyendo la población mestiza (mezcla de etnias) la más predominante en Venezuela.

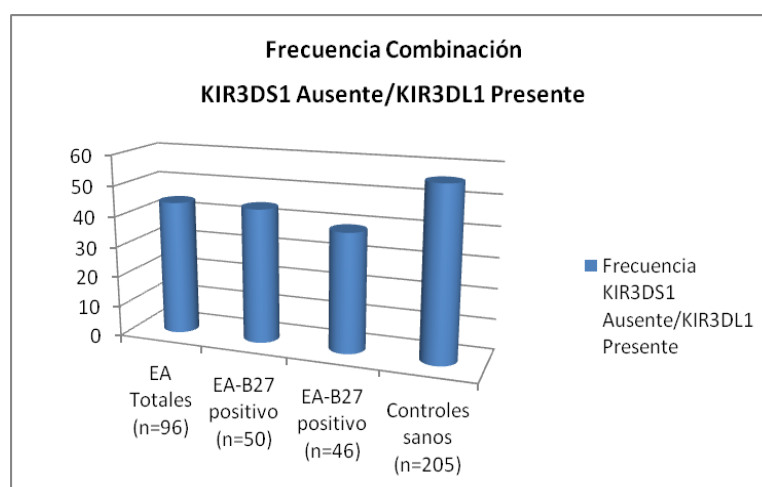
Finalmente, aunque *KIR3DS1* es un receptor activador que favorecería la activación de las células NK, y posiblemente de las sub-poblaciones de células T, explicando así su asociación con el desarrollo EA, es importante resaltar que la actividad de las células NK está finamente regulada por un grupo de receptores activadores e inhibidores, cuyo balance final, luego de interaccionar con su ligando específico, favorecerá o no a la activación de la célula frente a la célula blanco (Lanier, 2008). Por lo tanto, sería importante determinar los haplotipos de genes *KIR* (basados en el contenido de genes *KIR*) en pacientes con EA y controles sanos, para de esta manera establecer las posibles asociaciones entre estos haplotipos y el desarrollo de EA.

Finalmente, al comparar la frecuencia del gen *KIR3DS1* entre pacientes con diagnóstico presuntivo de EA, agrupados de acuerdo al alelo *HLA-B27* (positivo vs. negativo), no observamos una diferencia significativa.

### **3. Distribución de frecuencia de los genes *KIR3D***

Considerando que los genes *KIR3DL1/3DS1* son de particular interés en el desarrollo de EA, establecimos las combinaciones de ambos genes y observamos en los individuos con diagnóstico presuntivo de EA, independientemente de la presencia del alelo *HLA-B27*, que la combinación génica ***KIR3DS1* Ausente/*KIR3DL1* Presente** es la más frecuente, en concordancia a lo descrito en población venezolana sana (Conesa y col., 2010). Sin embargo, al comparar la frecuencia de esta combinación de genes observamos que está incrementada en los controles venezolanos con respecto al grupo total de individuos con diagnóstico presuntivo de EA y al grupo de pacientes con EA-*B27* negativo [44% en EA vs. 56% en controles;  $\chi^2= 3.67$ ;  $p= 0.02$ ], [44% en individuos con EA-*B27* positivo vs. 56% en controles;  $\chi^2= 0.93$ ;  $p= 0.16$ ] y [39% en individuos con EA-*B27* negativo vs. 56% en controles;  $\chi^2= 4.07$ ;  $p= 0.02$ ] (Figura 16). Estos resultados concuerdan

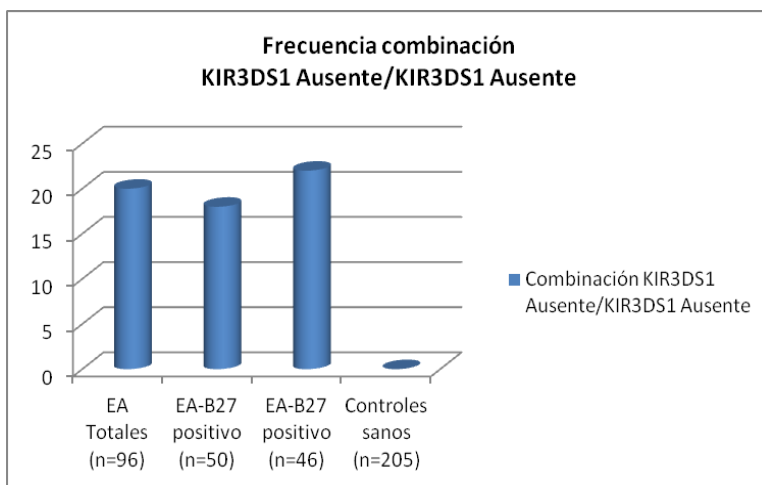
con lo descrito en poblaciones caucásicas, de España y Portugal (López-Larrea y col., 2006), y poblaciones asiáticas, de China y Tailandia (Díaz-Peña y col., 2008), en las cuales la frecuencia de la combinación génica ***KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Presente*** estaba incrementada en controles (*HLA-B27* positivo) con respecto a pacientes con EA (*HLA-B27* positivo). Sugiriendo que los individuos con esta combinación son menos propensos a desarrollar EA, y dicha protección posiblemente es conferida por la inhibición, de la actividad de las células NK/sub-poblaciones de células T, mediada por el receptor *KIR3DL1*.



**Figura 16. Distribución de la frecuencia de la combinación *KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Presente* entre individuos con diagnóstico presuntivo de EA y población general venezolana**

Finalmente, cabe destacar que en la población venezolana sana (Conesa y col., 2010) está ausente la combinación ***KIR3DS1-Ausente/KIR3DL1-Ausente***. En consecuencia, al comparar la frecuencia de esta combinación de genes observamos que está incrementada en individuos con diagnóstico presuntivo de EA, independientemente de la presencia de *HLA-B27*, con respecto a los controles venezolanos y [20% en EA vs. 0% en controles;  $\chi^2= 44.80$ ;  $p < 0.01$ ], [18% en individuos con EA-B27 positivo vs. 0% en controles;  $\chi^2= 41.76$ ;  $p < 0.01$ ] y [22% en individuos con EA-B27 negativo vs. 0% en controles;  $\chi^2= 50.38$ ;  $p < 0.01$ ] (Figura 17). Sugiriendo que los individuos con esta

combinación son más propensos a desarrollar EA, y dicha susceptibilidad posiblemente es conferida por la activación, de las células NK/sub-poblaciones de células T, mediada por otros receptores KIR activadores (Zuo y col., 2014)



**Figura 17. Distribución de la frecuencia de la combinación *KIR3DS1* Ausente/*KIR3DL1* Presente entre individuos con diagnóstico presuntivo de EA y población general venezolana**

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la susceptibilidad a desarrollar EA posiblemente está determinada por el equilibrio de señales de activación y de inhibición mediada por la interacción de los receptores KIR con sus ligandos HLA. Es concebible que los haplotipos de genes *KIR*, las variaciones alélicas de estos genes y sobre todo las combinaciones KIR-ligando específico, puedan jugar un papel importante en la susceptibilidad a desarrollar EA (Jiao y col. 2008). Por lo tanto, proponemos el estudio de haplotipos de genes *KIR*, la variabilidad alélica de sus genes, y en concordancia a lo descrito por López-Larrea y colaboradores (2006) realizar un análisis más detallado de la expresión de los receptores KIR en pacientes con espondilitis anquilosante lo que pudiese ayudar a dilucidar el papel de los receptores KIR en la predisposición.

## CONCLUSIONES

1. El alelo *HLA-B27* es un factor que confiere riesgo a desarrollar espondilitis anquilosante en la población venezolana
2. Los individuos que presentan el gen *KIR3DL1* y/o la combinación ***KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Presente*** son menos propensos a desarrollar EA, debido posiblemente a la inhibición, de la actividad de las células NK/células T, mediada por el receptor KIR3DL1.
3. Los individuos con la combinación ***KIR3DS1 Ausente/KIR3DL1 Ausente*** son más propensos a desarrollar espondilitis Anquilosante.
4. El desequilibrio entre los genes KIR activadores e inhibidores podría influir en la patogénesis de la EA, por una sobre activación o por la pérdida de inhibición de la células efectoras (NK/células T)

## BIBLIOGRAFIA

Alter, G. Martin, M. Teigen, N. Carr, W. Suscovich, T, Schneidewind, A Streeck, H. Y col. 2007. *Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes*. J Exp Med: **204**: 3027-36

Antoniou, A. Lenart, I. Guiliano D. 2011. *Pathogenicity of Misfolded and Dimeric HLA-B27 Molecules*. International Journal of Rheumatology. Volume 2011, Article ID 486856

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

Biassoni, R. Pessino, A. Malaspina, A. Cantoni, C. Bottino, C. Sivori, S. Moretta, L. Moretta, A. 1997. *Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules*. Eur J Immunol: **27**: 3095-9.

Boyle LH, Goodall JC, Opat SS, Gaston JS. 2001. *The recognition of HLA-B27 by human CD4(+) T lymphocytes*. J Immunol; **167**(5):2619-24.

Borrero M. Manual de laboratorio: Biología molecular celular experimentación con microarrays. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico 2011 (en línea) <http://alacima.uprrp.edu/Nuevo-Portal/wp-content/uploads/Manual-cel-molec-Final-VERSION-2013.pdf>

Bunce, M. 2000. *Histocompatibility testing*. Lidwell and Navarrette C. Imperial College Press, London.

Campbell KS, Purdy AK. 2011. *Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations*. Immunology, **132**, 315–325

Castro-Santos, P. Gutierrez, M. Díaz-Peña, R. 2014. *Genética, HLA-B27 y espondilitis anquilosante: 40 años*. Rev Med Chile; **142**: 1165-1173.

Carrington, M. Norman P. Williams, A. Bateman, A. Khakoo, S. 2005. *The KIR gene cluster. KIR and their role in disease*. Molecular Interventions; **5**: 226-240.

Carrington, M. Gao, X. Norman P. 2004 *KIR gene allele frequencies in populations from USA (African American) USA (European) and England*. Human Immunology; **65**: 1191.

Colbert, R. Tran, T. Lay-Schmitt, G. 2014. *HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis*. Molecular Immunology **57** (44– 51).

Colonna, M. Borsellino, G. Falco, M. Ferrara, G. Strominger, J. 1993. *H2-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; **90** 12000-12004

Conesa, A. Fernandez-Mestre, M. Padron, D. Toro, F. Silva, N. Tassinari, P. Blanca, I. Y colabradores. 2009. *Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the mertizo population from Venezuela*. Tissue Antigens. 2010 Jun;75(6):724-9.

HLA IPD IMGT/HLA [en línea] [www.ebi.ac.uk/imgt/hla/nomenclature/index.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/nomenclature/index.html)

Dakwar, E. Reddy, J. Vale, F. Uribe, J.2008. *A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis* . Neurosurgical Focus **24 (1): E2**

Dazhi F, Liu S, Ting Yang y col. 2014. *Association between KIR polymorphisms and ankylosing spondylitis in populations: A meta-analysis*. Modern Rheumatology. **24(6)**:985-991.

Devraj, J. Shankarkumar. Ghosh, U. 2009. *Increased frequency of HLA-B7 among B27-negative seronegative spondarthritis patients from Mumbai, Western India*. British Journal of Biomedical Science; **66( 1)**. 25–27.

Devraj, J. Shankarkumar, U. Ghosh, K.2014. *Role of HLA-B Alleles and Clinical Presentation of B27 Negative Spondyloarthritis Patients from Mumbai, Western India*. Autoimmune Diseases, Volume **2014**.

Díaz-Peña, R. Blanco-Gelaz, M. Suarez-Alvarez, B. Martinez-Borra, J. Lopez-Vazquez, A. Alonso-Arias, R. Bruges-Armas, J. Vidal- Castiñeira J. Lopez-Larrea, C. 2008. *Activating KIR genes are associated with ankylosing spondylitis in Asian populations*. Human Immunology; **69**, 437-442.

Díaz-Peña, R. Vidal-Castiñeira, JR. Mulero, J. Sánchez, A. Queiro, R. López-Larrea, C. 2015. *Activating killer immunoglobulin-like receptors genes are associated with increased susceptibility to ankylosing spondylitis*. Clinical & Experimental Immunology; **180(2)**:201-6.

Döhning, C. Scheidegger, D. Samaridis, J. Cella, M. Colonna, M. 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1, 2. The Journal of Immunology: **156**: 3098-101.

Dharashree, V. Pooja, R. Soham, T. 2012. *Optimization of In-House PCR-SSP Technique for HLA B27 detection in saurashtra patients*. International Journal of Modern Engineering Research (IJMER). **2 (3)**: 996-1000.

Fan, D. Liu, S. Yang, T. Wu, S. Wang, S. Li, G. Zeng, Z. y colaboradores. 2014. *Association between KIR polymorphisms and ankylosing spondylitis in populations: a meta-analysis*. *Modern Rheumatology*; **24(6)**:985-91.

Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger TA, Caligiuri MA. 2003. *Biology and clinical impact of human natural killer cells*. *International Journal of Hematology*; **78(1)**:7-13.

Fortes, M. Gil, G. Paredes, ME. Gamez, LE. Palacios, M. Blanca, I. Tassinari, P. 2012. *Allele and haplotype frequencies at human leukocyte antigen class I and II genes in Venezuela's population*. *Annales de Biologie Clinique.*; **70(2)**:175-81

Gardier C. 2007. *Killer cell immunoglobulin-like receptor son NK cells: The how, where and why*. *International Journal of Immunogenetics*; **35**:1-8.

González Cortiñas, M. 1998. *Patogenia de las espondiloartropatías seronegativas*. *Revista Cubana de Medicina*; **37(1)**:28-35

Gumperz, JE. Litwin, V. Phillips, JH. Lanier, LL. Parham, P. 1995. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *The Journal of Experimental Medicine*: **181**: 1133-44).

HLA Nomenclature. Nomenclature for factors of the HLA system [en línea] <http://hla.alleles.org>.

Hallet W y Murphy W. 2008. *Positive and negative regulation of natural killer cells: Therapeutic implications*. *Seminars in Cancer Biology*; **16**:367-382.

Harvey, D. Poiton, J. Sleator, C. Meenagh, A. Farrar, C. Sun, J. Senitzer, P. Middleton, .rown, M. Wordsworth, B. 2009. Analysis of killer immunoglobulin-Like receptor genes in ankylosing spondylitd. *Annals of the Rheumatic Diseases*; **68 (4)**: 595-8

Immuno polymorphism Database. IPD-KIR [en línea] <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>

Gómez-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**(3):184-93.

Jiao, YL. Ma, CY. Wang, LC. Cui, B. Zhang, J. You, L. Chen, ZJ. Y colaboradores. 2008. *Polymorphisms of KIR Gene and HLA-C alleles: Possible Association with susceptibility to HLA-B27-Positive Patients with Ankylosing Spondylitis.* The Journal of Clinical Immunology, **28**(4):343-9.

Jobim M, Jobim LF. 2008. *Natural killer cells and immune surveillance.* The Journal of Pediatrics (Rio J); **84** (4): 58-65.

Khan, M. Kushner, I. Braun, W. 1978. *B27-negative HLABW16 in ankylosing spondylitis.* The Lancet; **311** ( **8078**) 1370–1371.

Khan, M. Kushner, I. Braun, W. 1978. *A subgroup of ankylosing spondylitis associated with HLA-B7 in American blacks.* Arthritis and Rheumatism; **21**(5) 528–530 .

Khan, A. 1983. *B7-CREG and ankylosing spondylitis.* British Journal of Rheumatology; **22** (4) 129–133.

Khan, MA. Ball, EJ. 2002. *Genetic aspects of ankylosing spondylitis.* Best Practice & Research Clinical Rheumatology; **16**:675–90.

Khan, MA. 2010 *Remarkable Polymorphism of HLA-B27: An Ongoing Saga.* Current Rheumatology Reports; **12**:337–41.

Khan, MA. 2010. *HLA in spondyloarthropathies. Chapter 16. In: Mehra NK, editor. The HLA Complex in Biology and Medicine. A resource Book.* New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd; 259–75.

Katz, G. Markel, G. Mizrahi, S. Arnon, TI. Mandelboim, O. 2001 *Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4*. The Journal of Immunology; **166**: 7260–7.

Kollnberger, S. Bird, L. Sun, MY. Retiere, C. Braud, VM. McMichael, A. Bowness, P. 2002. *Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers*. Arthritis & Rheumatology; **46**: 2972-2982.

Kollnberger, S. Bird, LA. Roddis, M. Hacquard-Bouder, C. Kubagawa, H. Bodmer, HC. Breban, M. McMichael, AJ. Bowness, P. 2004. *HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors*. The Journal of Immunology, **173**:1699-1710

Kuby, J, Kindt, TJ; Osborne, BA y Goldsby, RA. (2006). Kuby Immunology. 6ta ed. Editorial: McMillan Higher Education. 338-360.

Kulkarni, S. Maureen, M. Carringtonb, M. 2008. *The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease*. Seminars in Immunology **20**; 343–352

Landaeta, M. 2010 *Comprendiendo la inmunopatogenia de las artropatías seronegativas*. Hospital Clinic Universidad de Chile. **26**(2):168-180.

Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. 1998. *Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells*. Nature; **391**: 703–707.

Lanier, L. 2008 *Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition*. Nature Immunology; **9**:503-510.

Lewis, L. 2005. *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol. **23**: 225-274

López-Larrea, C. Segundo, G. Martinez-Borra, J. 1998. The role of HLA-B27 polymorphism and molecular mimicry in spondyloarthropathy. Molecular Medicine Today; **4**:540-549

López-Larrea, C. Blanco-Gelaz, M. Torre-Alonso, J. Bruges-Armas, J. Suarez-Alvarez, B. Pruneda, L. Rita. A. Y col. 2006. *Contribution of KIR3DL1&3DS1 to ankylosing spondylitis in human leukocyte antigen-B27 caucasian populations*. Arthritis Research & Therapy. **8(4)**: R101

Lories, RJ. Luyten, FP. 2009. *Bone morphogenetic protein signaling and arthritis*. Cytokine & Growth Factor Reviews; **20(5-6)**: 467 – 73.

Majorczyk, E. Pawlik, A. Luszczek, W. Nowak, I. Wisniewski, A. Jasek, M. Kusnierczyk, P. 2007. *Associations of killer cell immunoglobulinlike receptor genes with complications of rheumatoid arthritis* . Genes & Immunity; **8(8)**: 678-83

Martin, MP. Gao, X. Lee, JH. Nelson, GW. Detels, R. Goedert, JJ. Buchbinder, S. Hoots, K. y col. 2002. *Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS*. Nature Genetic: **31**: 429-34.

Mousavi, T. Poormoghim, H. Moradi, M. Nader, T. Farhad, S. Behnam, A. 2010. *Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor KIR3DL1 in Combination with HLA-B Bw4 iso protect against Ankylosing Spondylitis*. Iranian Journal of Immunology; **7(2)**:88-95

Muro, M. Alvarez-Lopez, M. Moya-Queles, M. 2008. Histocompatibilidad en transplantes.

Murphy, K. Travers, P. Walport M. 2009. Inmunología de Janeway. Mc Graw Hill. Séptima edición. México DF.

Mullis, K. Faloona, F. 1987. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in Enzymology. **155**: 335-350.

Muhammad, A. 2013 *Polymorphism of HLA-B27: 105 Subtypes Currently Known*. Current Rheumatology Reports. **15**:362

Nader Tajik, Farhad, S. Kobra, E. Behnam, A. Kameam, A. Ardeshir, G.2011. *Donor KIR genotype with KIR2DS3 and/or KIR3DS1 increases survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia.* International Journal of Immunogenetics.;**38 (5)**:403-9)

Newman, K. Riley, E. 2007. *Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens.* Nature Reviews; **7**:279; 291.

Olsson, ML. 1998. *A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers.* Transfusion, **38(2)**:168-73.

Parham, P. 2005. *MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival.* Nature Reviews Immunology, **5**: 201-214.

Paul, W.E. 2008. Fundamental Immunology. Sixth Edition.

Quintero R. 1967. *Estudio de Caracas.* Caracas: Ediciones de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela : 2 (tomo I).

Robinson, W. Van der Linden. Khan, M y colaboradores. 1989. *HLABw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLAB27+ patients.* Arthritis and Rheumatism; **32 (9)**, 1135–1141.

Rajagopalan, S. Long, EO. 1999. *A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells.* The Journal of Experimental Medicine, **189**: 1093-100.

Robert, A. Tri, M. Layh-Schmitt, G. 2014. *HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis.* Molecular Immunology, **57**: 44– 51.

Sampaio-Barros, D. Conde, R. Donadi, E. y colaboradores. 2003. *Undifferentiated spondyloarthropathies in Brazilians: importance of HLA-B27 and the B7-CREG alleles in characterization and disease progression*. The Journal of Rheumatology; **30 (12)** 2632–2637.

Smith, J. Marker-Hermann, E. Colbert, E. 2006. *Pathogenesis of ankylosing spondylitis: Current concepts*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology; **20 (3)** 571–591. Sociedad Española de Reumatología. Espondilitis anquilosante 2012.

Shyamala, V. Ames, G. 1993. Genome walking by single specific primer-polymerase chain reaction. Methods Enzymology. **217**: 436-446.

Stewart-Jones, GB. Gleria, K. Kollnberger, S. McMichael, AJ. Jones, EY. Bowness, P. 2005. *Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B\*2705*. European Journal of Immunology; **35**:341-351

Svejgaard, A. Ryder, LP. 1994. *HLA and disease associations: detecting the strongest association*. Tissue Antigens; **43**: 18.

Ting, Y. Zhenhua, D. Shansan, W. Si, L. Zhen, Z. Guixing, L. Sheng W. Dazhi F. y col. 2014. *Association of HLA-B27 genetic Polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide a meta-analysis*. Modern Rheumatology, **24(1)**: 150-161

Torres-García, D. Barquera, R. Zuñiga, J. 2008. *Receptores de células NK (KIR): estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades*. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, **1**:57-65.

Tsui, F. Tsui, H. Akram, A. Haroon, N. Inman, R. 2014. *The genetic basis of ankylosing spondylitis: new insights into disease pathogenesis*. *The Application of Clinical Genetics*, **7** 105–115.

Valés-Gómez, M. Reyburn, HT. Erskine, RA. Strominger, J. 1998. *Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: **95** :14326-31.

Van der Linden, S. Valkenburg, H. Cats, A. 1984. *Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria*. *Arthritis and Rheumatism*; **27**( 4) 361–368.

Vanvi, D. Raja, P. Trivedi, S. 2012. *Optimization of In-House PCR-SSP Technique for HLA B27 detection in saurashtra patients*. *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER) Vol.2 (3)*, pp-996-1000

Vila, MA. 1978. *Geoeconomía de Venezuela del siglo XVII*. Caracas: Ediciones de la Facultad de Humanidades y Educación de la Universidad Central de Venezuela.

Vilches, C. Parham, P. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, **20**:217-51.

Vivier, E. Tomasello, E. Baratin, M. Walzer, T. Ugolini, S. 2008. *Functions of natural killer cells*. *Nature of Immunology*, **9**:503-510.

Wagener, P. Zeidler, H. Eckert, G. Deicher, H. 1983. *Increased frequency of HLA-Bw35 CREG antigens in HLA-B27 negative ankylosing spondylitis*. *British Journal of Rheumatology*; **24**.(4). 134–135.

Wei, J. Tsai, W. Lin, H. Tsai, C. Chou, C. 2004. *HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients*. *Rheumatology*; **43** (7) 839–842.

Yamaguchi, A. Tsuchiya, N. Mitsui, H. y colaboradores. 1995. *Association of HLA-B39 with HLA-B27-negative ankylosing spondylitis and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis in Japanese patients: evidence for a role of the peptide-anchoring B pocket*. *Arthritis and Rheumatism*; **38** (11) 1672–1677

Zuo, H. Wang, Z. Cui, R. Xin, D. 2014. Genetic variations in the KIR gene family may contribute to susceptibility to spondylitis : a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, **41** (8): 5311-9.

Zhuang, Y. Song, C. Zhu, Y. Zhang, D. Wang, X. Nie, Y. Liu, J. 2012. *Association of KIR Genotypes and Haplotypes with Syphilis in a Chinese Han Population*. *Scandinavian Journal of Immunology*; **75**, 361–367].

Zvyagin, I. Mamedov, I. Britanova, O. Staroverov, D. , Nasonov, E. Bochkova, A. Chkalina, A y col. 2010. *Contribution of functional KIR3DL1 to ankylosing spondylitis*. *Cellular & Molecular Immunology*; **7**, 471–476

## **Anexo 1. Consentimiento informado**

### **INFORMACIÓN PARA LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO**

La Sección Inmunogenética del Laboratorio de Fisiopatología, del Centro de Medicina Experimental, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) llevará a cabo el proyecto de investigación titulado “Determinación del alelo *HLA-B27* y de los genes *KIR3D* en pacientes con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante”

Para realizar la investigación señalada, se contará con un grupo de participantes con sintomatología de espondilitis anquilosante (dolor lumbar o lumbago, principalmente), quienes serán remitidos por diferentes centros de salud, tanto públicos, como privados

Su participación en el proyecto, consiste en donar una muestra de sangre de 5 mL. Las muestras a donar así como la información que suministre al equipo de investigadores serán utilizadas para estudiar marcadores biológicos. Las muestras serán extraídas por personal calificado, bajo la supervisión de la Dra. Mercedes Fernández, en el Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental, IVIC.

Las muestras serán almacenadas por la Doctora Mercedes Fernández-Mestre en el Laboratorio de Fisiopatología del IVIC, para ser utilizadas en futuras investigaciones, que permitan conocer más acerca de la espondilitis anquilosante, bajo previa aprobación de la Comisión de Bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Ni los estudios realizados en las muestras de sangre por Ud. donadas, ni las evaluaciones clínicas realizadas tendrán ningún costo económico para usted. Asimismo, dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno adicional para su salud. Usted puede retirarse del proyecto en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para usted.

Los resultados obtenidos en el presente estudio solamente serán usados con fines académicos y si Usted lo solicita se le entregará un informe de los mismos. El equipo de investigadores le garantiza confidencialidad relacionada tanto con su identidad como la de cualquier información relativa a su persona a la que tengan acceso por concepto de su participación en el proyecto antes mencionado.

En caso de presentarse algún problema o tener cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio, le será respondida oportunamente por la Dra. Mercedes Fernández, investigadora participante en el estudio, con quien me puedo comunicar por los teléfonos: 0212-5041909.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha:

Yo, \_\_\_\_\_ C.I.: \_\_\_\_\_

Nacionalidad: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_ Domiciliado en: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, en uso pleno de mis facultades, sin que medie coacción ni violencia alguna, y en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio denominado "Determinación del alelo *HLA-B27* y de los genes *KIR3D* en pacientes con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante", que será llevado en el Laboratorio de Fisiopatología, del Centro de Medicina Experimental-IVIC, declaro mediante la presente:

- 1) Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, por parte del grupo de médicos e investigadores de todos los aspectos relacionados al proyecto antes mencionado.
- 2) Tener conocimiento claro de que el objetivo fundamental del trabajo antes señalado es determinar la presencia del alelo *HLA-B27* y de los genes de receptores *KIR* (*KIR3DL1*, *KIR3DS1* y *KIR3DL2*) en pacientes con diagnóstico presuntivo de espondilitis anquilosante.
- 3) Haber sido informado que debido a que sufro de síntomas relacionados con espondilitis anquilosante (dolor lumbar o lumbago, principalmente), mi participación en el proyecto consiste en donar de manera voluntaria 5 ml de sangre periférica, extraída de la vena de la región anterior del antebrazo, previa desinfección del área de la piel, por una persona capacitada, con el fin de realizar las pruebas pertinentes al estudio.
- 4) Que estoy de acuerdo en el uso, para fines académicos, de los resultados obtenidos en el presente estudio, los cuales podrán ser publicados en revistas de carácter científico, pero el nombre o identidad no será revelado, y los datos clínicos y experimentales permanecerán confidenciales, a menos que sea solicitado por ley.
- 5) Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir algún beneficio de tipo económico, producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación. Al participar en este estudio podré tener conocimiento de los resultados si así lo solicitara.

6) Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente por parte del equipo de investigadores: Dra. Mercedes Fernández-Mestre, con quien me puedo comunicar por los teléfonos 0212- 5041909/ 5041155/ 5041163

**DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:**

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a esta planilla de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores del Laboratorio de Fisiopatología, del Centro de Medicina Experimental (IVIC) que acepto donar la muestra de sangre periférica a los fines indicados anteriormente.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del Voluntario: \_\_\_\_\_  
Apellido y Nombre: \_\_\_\_\_  
C.I.: \_\_\_\_\_

Firma del Investigador: \_\_\_\_\_  
Apellido y Nombre: \_\_\_\_\_  
C.I.: \_\_\_\_\_

Firma del Testigo: \_\_\_\_\_  
Apellido y Nombre: \_\_\_\_\_  
C.I.: \_\_\_\_\_

Firma del Testigo: \_\_\_\_\_  
Apellido y Nombre: \_\_\_\_\_  
C.I.: \_\_\_\_\_

**DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:**

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Nombre y Apellido del Investigador

Firma

Lugar y Fecha

## **Anexo 2. Preparación de soluciones**

### **1. Obtención de la muestra de muestra**

EDTA 0,4M pH 8

148,88 g en 1 litro, autoclavar

Para cada 10 ml de sangre 100 µl de EDTA 0,4M

### **2. Reactivos para extracción del ADN.**

#### **RCLB**

0,144 M de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

1mM de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )

Disolver 15,4 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 1,68 M de  $\text{NaHCO}_3$  en 2 litros de  $\text{H}_2\text{O}$  dd.

#### **Buffer de lisis nuclear (NLB)**

10 mM Tris-HCl pH 8,2

0,4 cloruro de sodio (Na Cl)

2mM de EDTA disódico pH 8,0

Disolver 23,37 g de NaCl en 900 ml de agua destilada. Añadir 10 ml de Tris-HCl 1 M pH 8,2 y 10 ml de EDTA disódico pH 8.0 y alcanzar un litro con  $\text{H}_2\text{O}$  dd.

#### **Buffer NLB + SDS**

Combinar 300 ml de NLB con 20 ml de SDS 10%, almacenar a 20°C para prevenir la formación de precipitados

#### **Etanol 95%**

Combinar 950 ml de etanol absoluto con 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  dd.

#### **Etanol 70%**

Combinar 700 ml de etanol absoluto y 300 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  dd.

**NaCl 5,25M** PM= 58,44 g/mol

Disolver con calentamiento 11,1 g de NaCl en 800 ml de H<sub>2</sub>O dd y alcanzar un litro con H<sub>2</sub>O dd.

**Buffer TE 1X**

10 mM TrisHCl

1 mM EDTA

Preparación:

**Acido Clorhídrico 1M (HCl, 1M):**

8.62 mL de HCl concentrado a

91 mL de dH<sub>2</sub>O

Aforar a 100 mL con dH<sub>2</sub>O.

**Hidróxido de Sodio 10M (NaOH, 10M)**

40 g de NaOH

40 mL de dH<sub>2</sub>O previamente

Aforar a 100 mL con dH<sub>2</sub>O.

**Solución 1M Tris HCl**

121 g de Tris Base

800 mL de dH<sub>2</sub>O.

Ajustar a pH 8.0 con 1M HCl

Conservar refrigerada entre 4 y 8°C.

**Solución 0.5M EDTA pH 8.0**

186.1 g de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O

700 ml de dH<sub>2</sub>O.

Ajustar a pH 8.0 con NaOH 10M (~50 ml)

Aforar con dH<sub>2</sub>O a un litro.

### **3. Reactivos para gel de electroforesis**

#### **TBE 10X pH 8.2**

Trisma base 60,6 g

Acido Bórico 41,4 g

EDTA 0,25 M 40 ml.

#### **TBE 1X**

100 ml de TBE 10X y añadir agua hasta llevar a un litro.

#### **Bromuro de etidio**

Bromuro de etidio 10 mg/ml.

El bromuro de etidio es altamente mutagénico, guardar en envase oscuro y a 4°C.

#### **Buffer de Carga (Azul de Bromofenol)**

TBE 10X 5ml

Glicerol 4,9 ml

SDS 10% 0,1 ml

Añadir pequeñas cantidades de Azul Bromofenol.