
Asociación HLA clase I y leucemia en pacientes mestizos del estado Zulia, Venezuela.

Carmen Villalobos¹, Sergio Rivera^{1,2}, Jesús Weir-Medina^{1,2}, Manzur Hassanhi^{1,2}, Milagros Montiel¹ y Romer González¹.

¹Facultad de Medicina, Universidad del Zulia e ²Instituto Hematológico de Occidente. Maracaibo, Venezuela

Palabras clave: HLA, Leucemia, RR y PCR-SSP.

Resumen. La asociación entre los Alelos Leucocitarios Humanos (HLA) clase I (A, B, C) y las Leucemias Linfoides Agudas y Mieloides, se determinó mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específica (PCR-SSP) en un grupo de 60 pacientes y 30 controles sanos. Los valores obtenidos se expresaron como frecuencias alélicas y haplotípicas. Se utilizaron como métodos estadísticos la prueba de Chi-cuadrado corregida, test de Fisher, riesgo relativo y la fracción etiológica. Se observó una asociación positiva significativa de los alelos HLA-B*39 (RR = 16,184, p = 0,0237) y HLA C*03 (RR = 5,0; p = 0,0127) con las Leucemias Mieloides (aguda y crónica). Así mismo se encontraron asociaciones positivas de los haplotipos de 2 loci: HLA-A*02-C*03 (RR = 6,0; p = 0,0153), A*24-C*03 (RR = 16,184; p = 0,0237), B*40-C*03 (RR = 10,706; p = 0,0021) y un haplotipo de 3 loci: HLA-A*02-B*40-C*03 (RR = 8,11; p = 0,0102) con las Leucemias Mieloides. No se evidenció ningún tipo de asociación con la Leucemia Linfocítica Aguda. No se observaron asociaciones negativas con ningún tipo de Leucemia.

HLA class I and leukemia association in mestizo patients from Zulia state, Venezuela.

Invest Clín 2003; 44(4): 283 - 289

Key words: HLA, Leukemia, RR, PCR-SSP.

Abstract. The Human Leukocyte Allele (HLA) Class I (A, B, C) and Acute Lymphoid Leukemia and Myeloid Leukemia association, was determined by polymerase chain reaction - sequence specific primers (PCR-SSP) in 60 pa-

tients and 30 healthy controls. The results were reported as allelic frequencies and haplotype. The Chi-square corrected, Fisher's Test, Relative risk and etiologic fraction were calculated. A significant positive association was showed between HLA-B*39 (RR = 16.184; p = 0.0237) and HLA C*03 (RR = 5.0; p = 0.0127) alleles and Myeloid Leukaemia. Positive associations between haplotypes 2 loci: HLA-A*02-C*03 (RR = 6.0; p = 0.0153), A*24-C*03 (RR = 16.184; p = 0.0237), B*40-C*03 (RR = 10.706; p = 0.0021) and haplotype 3 loci: HLA-A*02-B*40-C*03 (RR = 8.11; p = 0.0102) and Myeloid Leukemia were found. No association was evident in Acute Lymphoid Leukemia. No negative association with Leukemias were observed.

Recibido: 13-09-2002. Aceptado: 07-07-2003.

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas son proliferaciones malignas de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico superior al 30%, cuya acumulación progresiva se acompaña de una disminución en la producción de los elementos mieloides normales (1).

La primera evidencia sugestiva de asociación entre neoplasias hematológicas y genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) fue la observación de que ciertas cepas de ratones con una alta incidencia de leucemia poseían el mismo haplotipo H-2 (2). El descubrimiento de que el haplotipo H-2^b confería resistencia al virus de la leucemia de Gross y que el haplotipo H-2^k se asocia con el incremento de la susceptibilidad a la leucemogénesis, sugirió la posibilidad de asociaciones entre leucemias humanas y los productos de los genes del sistema HLA (Human Leukocyte Antigen) (3, 4).

En las últimas décadas se han realizado múltiples estudios sobre las asociaciones de los antígenos humanos de histocompatibilidad HLA y diferentes enfermedades (5). En diversas afecciones neoplásicas y no neoplásicas en el hombre se han informado asociaciones positivas (6,7). Es conocida la asociación existente entre enfermedades autoinmunes y alelos HLA específicos, como los observados en la espondilitis an-

quilosante con HLA-B27, y en la diabetes mellitus juvenil con DQw2 y DQw3, por citar dos ejemplos donde las asociaciones están bien establecidas (7-10)

El primer estudio en leucemia en humanos realizado por serología reportó una frecuencia aumentada del antígeno HLA-A2 en Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) (11).

El advenimiento de las técnicas de secuenciación de ADN ha demostrado que el polimorfismo de los genes HLA es mucho mayor que el obtenido por serología. Los métodos de biología molecular son muy confiables y sensibles, siendo útiles tanto para la discriminación de alelos de reactividad cruzada por serología como para la caracterización de subtipos. Por lo tanto, la diversidad alélica de cada uno de los loci específicos apoya la importancia de la aplicación de los métodos basados en biología molecular especialmente en la evaluación de donantes y receptores para transplantes. Por otra parte, esta metodología ha servido no solamente para definir un número creciente de variantes sino para constatar que el número y clase de productos HLA varían en diferentes haplotipos (12-16).

La tipificación de alelos y haplotipos HLA Clase I, por medio de las técnicas moleculares con la reacción en cadena de la polimerasa y posterior tipificación con iniciadores de secuencias específicas (PCR-SSP) de pacientes con Leucemias (Leuce-

mia Linfoide Aguda y Leucemia Mieloide), en comparación con individuos sanos, no relacionados de la población mestiza del Estado Zulia, permitirán estudiar la posible asociación entre ambos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, transversal y controlado, para lo cual se seleccionaron al azar 60 individuos de ambos sexos, entre 3 y 72 años, mestizos, no relacionados genéticamente, con diagnóstico reciente de Leucemia Linfoide Aguda (LLA; n=30), 26 Leucemias Mieloides Agudas y 4 Leucemias Mieloides Crónicas, las cuales se evaluaron en conjunto como Leucemias Mieloides (LM; n= 30), y un grupo de individuos sanos (n=30), residentes en el Estado Zulia. La presencia de cualquier otra patología fue motivo de exclusión del estudio.

Todos los pacientes fueron diagnosticados y evaluados en el Laboratorio de Citometría y Laboratorio de HLA e Inmunología del Instituto Hematológico de Occidente (Banco de Sangre del Estado Zulia) previo consentimiento de ellos.

Se diagnosticaron las leucemias utilizando la técnica de Citometría de Flujo (17). Se utilizó para la Extracción de ADN el método de "Salting-out" con modificaciones (18) de la técnica original de Miller. (19).

La amplificación del ADN se realizó mediante la técnica de PCR-SSP (Reacción en cadena de la polimerasa) con iniciadores de secuencia específica utilizando el Kit Olerup HLA A-B-C SSP Combi Tray de Genovision. Los valores obtenidos se expresaron como frecuencias alélicas y haplotípicas (20, 21). Para hacer comparación entre las frecuencias alélicas y de haplotipos HLA de 2 y 3 loci de los grupos de estudio, se utilizó la Prueba de Chi-cuadrado corregida. Para los valores inferiores a 5, se calculó el Test de Fisher. Se tomó el 95% como índice de confiabilidad estadística ($p < 0,05$) (21,

22). Para estimar la fortaleza de asociación entre los alelos y haplotipos HLA de 2 y 3 loci y las Leucemias se calculó el riesgo relativo (RR) (23, 24). Se obtuvo la fracción etiológica para asociaciones positivas ($RR > 3$), ya que esta es una medida relativa, que indica cuanto de la asociación se debe al marcador en cuestión; mientras más se acerca el valor a 1, más se debe la enfermedad al marcador (25).

RESULTADOS

Al comparar las frecuencias alélicas HLA clase I de los individuos sanos con las frecuencias alélicas de los pacientes leucémicos, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con Leucemia Linfoide Aguda.

Se observó un incremento significativo en la frecuencia de los alelos HLA-B*39 ($p = 0,0237$) y HLA C*03 ($p = 0,0137$) exclusivamente en pacientes con Leucemia Mieloide; el riesgo relativo obtenido (superior a 3) determinó una asociación positiva. Las frecuencias alélicas, riesgo relativo y fracción etiológica se detallan en la Tabla I.

Varios haplotipos HLA Clase I de 2 loci, mostraron diferencias significativas en pacientes con Leucemias Mieloides con respecto a los controles. Los haplotipos HLA-A*02-C*03 ($p = 0,0153$), A*24-C*03 ($p = 0,0237$), y B*40-C*03 ($p = 0,0021$), se encontraron asociados positivamente a las Leucemias Mieloides. Sus frecuencias haplotípicas, riesgo relativo y fracción etiológica se muestran en la Tabla II.

El haplotipo HLA de 3 loci HLA-A*02-B*40-C*03 ($p = 0,0102$) se observó asociado positivamente a la Leucemia Mieloide con un riesgo relativo de 8,11 (Tabla III).

No se establecieron asociaciones de haplotipos HLA de 2 y 3 loci con la Leucemia Linfoide Aguda.

No se encontraron asociaciones negativas en ningún tipo de Leucemia.

TABLA I
ALELOS HLA CLASE I EN ASOCIACIÓN POSITIVA CON LAS LEUCEMIAS MIELOIDES DE LA POBLACIÓN MESTIZA ZULIANA

| Alelo | Frecuencia alélica | | | | p | RR | FE |
|-------|--------------------|-----|--------------------|------|---------------------|--------|------|
| | Controles (N = 30) | | Pacientes (N = 30) | | | | |
| | n | %fa | n | %fa | | | |
| B*39 | 0 | 0,0 | 6 | 10,0 | 0,0237 ¹ | 16,184 | 0,94 |
| C*03 | 5 | 8,3 | 15 | 30,0 | 0,0137 ² | 5,000 | 0,60 |

n = número individuos portadores del haplotipo. Fa = frecuencia alélica. p = probabilidad.
RR = Riesgo Relativo. FE = Fracción etiológica. ¹Test de Fisher. ²Chi-cuadrado corregido.

TABLA II
HAPLOTIPOS HLA CLASE I DE 2 LOCI EN ASOCIACIÓN POSITIVA CON LAS LEUCEMIAS MIELOIDES DE LA POBLACIÓN MESTIZA ZULIANA

| Haplotipo | Frecuencia Haplotípica | | | | p ¹ | RR | FE |
|-----------|------------------------|-----|--------------------|------|----------------|--------|------|
| | Controles (N = 30) | | Pacientes (N = 30) | | | | |
| | n | %fh | n | %fh | | | |
| A*02-C*03 | 3 | 2,5 | 12 | 10,0 | 0,0153 | 6,00 | 0,66 |
| A*24-C*03 | 0 | 0,0 | 6 | 5,0 | 0,0237 | 16,184 | 0,94 |
| B*40-C*03 | 2 | 1,7 | 13 | 10,8 | 0,0021 | 10,706 | 0,79 |

n = número individuos portadores del haplotipo. Fh = frecuencia haplotípica. p = probabilidad.
RR = Riesgo Relativo. FE = Fracción etiológica. ¹Test de Fisher.

TABLA III
HAPLOTIPOS HLA CLASE I DE 3 LOCI EN ASOCIACIÓN POSITIVA CON LAS LEUCEMIAS MIELOIDES DE LA POBLACIÓN MESTIZA ZULIANA

| Haplotipo | Frecuencia Haplotípica | | | | P1 | RR | FE |
|----------------|------------------------|-----|--------------------|-----|--------|------|------|
| | Controles (N = 30) | | Pacientes (N = 30) | | | | |
| | n | %fh | n | %fh | | | |
| A*02-B*40-C*03 | 2 | 0,8 | 11 | 4,6 | 0,0102 | 8,11 | 0,74 |

n = número individuos portadores del haplotipo. Fh = frecuencia haplotípica. p = probabilidad.
RR = Riesgo Relativo. FE = Fracción etiológica. ¹Test de Fisher.

DISCUSIÓN

La evaluación de 60 pacientes con leucemia mostró asociaciones positivas altamente significativas con varios alelos HLA Clase I.

No se observó ninguna asociación entre alelos HLA y Leucemias Linfoides Agu-

das (LLA) utilizando la técnica de PCR-SSP. Este resultado concuerda con lo reportado por Müller y col. (26) quienes trabajaron con las técnicas de PCR-SSP y SSO; y no observaron ningún tipo de asociación. Sin embargo, por serología se han publicado varias asociaciones positivas y negativas de antígenos HLA con las Leucemias Linfoides. Las

asociaciones positivas reportadas fueron HLA-A2, B5, Cw3, Cw4, Cw7 (27-31). Mientras que las negativas fueron HLA-A9, A19, A11, B12 y Cw1. (27, 31-33). Esto se puede explicar por el bajo grado de resolución de las técnicas serológicas y el elevado polimorfismo detectado por las técnicas moleculares, lo cual obliga a aumentar considerablemente el número de pacientes estudiados.

En Leucemias Mieloides se observaron asociaciones positivas en los alelos HLA-B*39 y el HLA-C*03. Son escasos los reportes de asociaciones HLA y Leucemias Mieloides realizados con técnicas de Biología Molecular y en ninguno se menciona esta asociación.

De las 30 Leucemias Mieloides evaluadas, 4 fueron diagnosticadas como Leucemias Mieloides Crónicas y 26 como Leucemias Mieloides Agudas. Para efecto de la asociación con el HLA se reportaron como Leucemias Mieloides totales.

Se han citado varias asociaciones positivas y negativas de antígenos HLA con las Leucemias Mieloides, utilizando técnicas serológicas. Las positivas fueron HLA-A3, A32, B21, B27, Cw3, Cw4 y Cw7 (7, 29, 34). Los antígenos HLA-A3, A9, A19, B8, B12, B35 y Cw1 (29, 31, 34, 35), se reportaron como asociaciones negativas.

En Leucemias Linfoides no se encontraron asociaciones con haplotipos.

Una asociación positiva con el HLA-A1-B8-Cw7 ha sido publicada por Muller, utilizando técnicas serológicas.

En Leucemias Mieloides se encontró una asociación positiva con varios haplotipos HLA clase I de 2 loci, los cuales fueron: A*02-C*03, A*24-C*03, B*40-C*03; y con un haplotipo HLA de 3 loci: HLA A*02-B*40-C*03. No se observaron asociaciones negativas con haplotipos. La asociación Haplotipos HLA con Leucemias no ha sido reportada por técnicas moleculares.

Estudios serológicos de HLA realizados a la tribu Venezolana Barí, muestran una

alta frecuencia antigénica del HLA-B39 (24,3%) y del Cw3 (43,9%); y haplotípica del HLA-B40-Cw3 (39,1%) y del HLA-A2-B40-Cw3 (4,7%). Tomando en cuenta que esta población no se ha mezclado con Caucásicos o Negroides (36); sería interesante evaluar la posible asociación HLA - Leucemias Mieloides en esta población.

Se hace necesario continuar evaluando estos pacientes con Leucemias para establecer cuales son los subtipos del HLA-B*39 y HLA-C*03 asociados; y poder detectar otras posibles asociaciones en concordancia con las reportadas por estudios serológicos previos para los alelos HLA Clase II.

AGRADECIMIENTO

Los Autores agradecen a la Maestría de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, al Instituto Hematológico de Occidente-Banco de Sangre del Estado Zulia.

Este trabajo fue cofinanciado por el CONDES, proyecto N° 096-22000.

REFERENCIAS

1. **Woessner S, Florensa L.** Introducción al estudio de las leucemias agudas. Clasificación. Descripción de las distintas variedades. Formas especiales. En: Castillo R, Woessner S. Hematología Clínica. 4ª edición. Barcelona (España): Ediciones Harcourt; 2001. P 345-346.
2. **Lilly F.** The influence of H-2 type on gross leukemogenesis in mice. *Transplant Proc* 1971; 3:1239-1241
3. **Lilly F, Boyse EA, Oid LJ.** Genetic basis of susceptibility to viral leukaemogenesis. *Lancet* 1964; 2:1207-1209.
4. **Lilly F.** The inheritance of susceptibility to the gross leukemia virus in mice. *Genetics* 1966; 53:529-539.
5. **Robinson D, Nepom G.** The human major histocompatibility complex and disease susceptibility. *Immunol Al Clin N American* 1993; 13(2):255-272.

6. Schlosstein L, D. M, Terasaki P, Bluestone R, Pearson C. High association of an HLA antigen, W27, with Ankylosing Spondylitis. *N Eng J Med* 1973; 288(14): 704-706.
7. Au W, Hawkins B, Cheng N, Lie A, Liang R, Kwong Y. Risk of haematological malignancies in HLA-B27 carriers. *Br J Haematol* 2001; 115:320-322.
8. Arce S, Inda R, Morera L, Ustariz C, Ballaster J. Frecuencia fenotípica y génica de antígenos HLA en la Miastenia gravis. *Rev Neurol* 1980; 34:27-32.
9. Bach J. Organ-specific autoimmunity. *Immunol Today* 1995; 16(7):353-355.
10. Nepom B. The role of the mayor histocompatibility complex in autoimmunity: *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 67(3):50-55.
11. Dausset J. The major histocompatibility complex in man. *Science* 1981; 213:1469-1474.
12. Blank M, Blank M, King S, Yashiki S, Kuwayama M, Fujiyama C, Gongora D, Zaninovic V, Cranston B, Hanchard B, Imanishi T, Manns A, Blattner WA, Tajima K, Hayami M, Fuyiyoshi T, Sonoda T. Distribution of HLA and haplotypes of Colombian and Jamaican black populations. *Tissue Antigens* 1995; 45:111-116
13. Bunce M, O'neill C, Bernardo M, Krausa P, Browning M, Morris P, Welsh K. Phototyping comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mix utilizing sequence-specific primer (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46:355-367.
14. Dieye A, Diaw M, Rogier C, Trape J, Sarthou J. HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ typing in a population group of Senegal: distribution of HLA antigens and HLA-DRB1*13 and DRB1*11 subtyping by PCR using sequence-specific primer (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1996; 47:194-199.
15. Hashimoto M, Kinoshita T, Yamasaki M, Hidenori T, Imanishi T, Ihora H, Ichikawa Y, Fukunishi T. Gene frequencies and haplotypic associations within the HLA region in 916 unrelated Japanese individuals. *Tissue Antigens* 1994; 44:166-173.
16. Makhatadze N, Franco M, Layrresse Z. HLA class I and class II allele and haplotype distribution in the Venezuelan population. *Hum Immunol* 1997; 55:53-58.
17. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwing WD, Matutes E, Orfao A. European group for the immunological characterization of leukaemia (EGIL). Proposals for the immunological classification of acute leukaemia. *Leucemia* 1995; 9:1783-1786.
18. Gorodezky C, Alaez C, Vásquez M, Infante E, Balladares S, Moreno M, Olivo A, Debaz H, Hernandez A. Manual de Procedimientos de Genética Molecular. Mexico, 2000.
19. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988,16(3):1215
20. Pineda B.L. Genética de Poblaciones: Problemario. Maestría en Genética. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. 1999.
21. Hilliard Festenstein and Peter Démant. HLA and H-2. Basic Immunogenetics, Biology and Clinical Relevance. Edward Arnold. 1978.p25-29.
22. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Bioestadística médica. 2ª edición. México, D.F. Santa Fé de Bogotá: Editorial El Manual Moderno. 1997.
23. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 19:251-253.
24. Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ration of frequencies. *Ann Hum Genet* 1956; 20:309-311.
25. Gorodezky C. Métodos para el análisis estadístico del complejo HLA. Mexico, 2000. p.1-9.
26. Muller LP, Langner J, Schaaf A, Schoner-marck U, Kujat G, Machulla H. Association of Chronic lymphocytic leukemia with specific alleles of the HLA-DR4:DR53:DQ8 haplotype in German patients. *Intern J Cancer* 2001;92(2):203-207.
27. Khosravi F, Amirzargar AA, Danesh A, Sarrafnejad A. A preliminary study of HLA class I (A,B) and HLA class II (DRB) asso-

- ciation in iranian patients with acute lymphoblastic leukemia. (abstrat). XIII International Congress of Histocompatibility and Immunogenetics. Seattle, WA, USA. *Tissue Antigens* 2002;59 (Sup 2) p.18.
28. **D'Amaro J, Bach F, Van Rood J, Rimms A, Bortin M.** HLA associations with acute leukemia. *Lancet* 1984;1176-1178.
 29. **Bortin MM, D'Amaro J, Bach Fil, Rirm AA, Van Rood JJ:** HLA associations with leukaemia. *Blood* 1987;70:227-232.
 30. **Muller CA, Ilasmann R, Grosse Wildee FI:** Signiftcant association of acute lymphoblastic leukaemia with HLA-Cw7. *Genet Epidemiol* 1988; 5:453-461.
 31. **Villalobos C, Rivera S, Hassanhi M, Bermudez A, Montiel M, Marquez G, Nuñez J, Cipriani A.** HLA by serology and molecular biology (PCR-SSP) in patients with leukaemia belonging to the Zulia State Blood Bank. XIII International Congress of Histocompatibility and Immunogenetics. Seattle, WA, USA. *Tissue Antigens* 2002; 59 (Sup 2) p.138
 32. **Klouda P, Lawler S, Till M, Hardisty R.** Acute Lymphoblastic Leukaemia and HLA: A prospective study. *Tissue Antigens* 1994; 4:262-265.
 33. **Navarrete C, Alonso A, Awad J, McCloskey D, Ganesan T, Amess J, Lister A, Festenstein H.** HLA class I and class II antigen associations in acute leukaemia. *J Immunogen* 1986; 13:77-84.
 34. **Amirzagar AA, Khosravi F, Sarrafnejad A.** HLA class I (A,B) and HLA class II (DRB) association in iranian myeloid leukemia patients. XIII International Congress of Histocompatibility and Immunogenetics. Seattle, WA, USA. *Tissue Antigens* 2002; 59 (Sup 2) p.11.17.
 35. **Posthuma E, Falkenburg J, Apperley J, Gratwohl A, Hertenstein B, Schipper R, Oudshoorn M, Biezen J, Hermans J, Willemze R.** HLA-DR4 is associated with a diminished risk of the development of chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia* 2000; 14(5):859-862.
 36. **Layrisse Z, Guedez Y, Dominguez E, Herrera F, Soto M, Balbas O, Matos M, Alfonso JC, Granados J, Scorozza J.** Extended HLA haplotypes among the Bari Amerindians of the Perija Range. Relationship to other tribes based on four-loci haplotype frequencies. *Hum Immunol* 1995; 44:228-235.