



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Utilidad de los genes KIR en la predicción de la evolución clínica
del trasplante hepático por alcoholismo y su uso como
biomarcadores antropológicos forenses de diferenciación de
poblaciones

D. José Miguel Bolarín Guillén
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Utilidad de los genes KIR en la predicción de la evolución clínica del trasplante hepático por alcoholismo y su uso como biomarcadores antropológicos forenses de diferenciación de poblaciones

Autor: D. José Miguel Bolarín Guillén

Director/es: D. Isabel Legaz Pérez y D. Manuel Muro Amador



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. José Miguel Bolarín Guillén

doctorando del Programa de Doctorado en

Integración y Modulación de Señales en Biomedicina

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Utilidad de los genes KIR en la predicción de la evolución clínica del trasplante hepático por alcoholismo y su uso como biomarcadores antropológicos forenses de diferenciación de poblaciones

y dirigida por,

D./Dña. Isabel Legaz Pérez

D./Dña. Manuel Muro Amador

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 28 de marzo de 2023

Fdo.: José Miguel Bolarín Guillén

VI

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Agradecimientos

No te preocupes si no puedes ir tan rápido como quisieras, lo importante es que no te detengas jamás.
Miguel Alfonso Fernández Guirado, mi padrino.

Hace ya muchos años que me matriculé por primera vez en un programa de doctorado, tras licenciarme en Química en la Universidad de Murcia. Durante ese tiempo pasé de ser becario de espectroscopía en la Facultad de Química a convertirme en *data manager* en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, bajo la dirección de la Dra. María rocío Álvarez, donde me introduje en el mundo de la investigación biomédica. Aunque comencé siendo “el chico de los ordenadores” de *inmuno*, y pasaba la mayor parte del tiempo entre hojas de Excel y bases de datos, gracias a la bioestadística y la bioinformática pude integrarme en el equipo de investigadores y contribuir a los proyectos científicos, adentrándome en los campos de la inmunología y la inmunogenética. Gracias a ello, puedo presentar hoy esta tesis doctoral.

Fueron casi nueve años que marcaron mi vida, no solo por lo que aprendí, sino por la gente a la que tuve la suerte de conocer. ¡Cuántos recuerdos felices guardo de aquella época, cuántas risas y cuántas satisfacciones! Y aunque también hubo discusiones y sinsabores, no cambiaría ni un solo minuto de los que pasé allí. Sois muchos los que coincidísteis conmigo en esa época, algunos solo durante unas semanas, otros durante los nueve años, y a todos os doy las gracias por haberme acogido en *inmuno* y haberme hecho sentir parte de una gran familia. Os llevaré siempre en mi recuerdo.

No voy a personalizar mis agradecimientos, porque sois demasiados los que me gustaría nombrar aquí y no quiero que nadie se quede fuera, y desgraciadamente hay quien no podrá ni siquiera leer esto porque ya no está entre nosotros. Solo voy a hacer tres excepciones. En primer lugar, con Isabel Legaz y Manuel Muro, dos excelentes profesionales y aún mejores personas, que comenzaron siendo mis compañeros y que posteriormente tuve el privilegio de que se convirtieran en los directores de mi tesis. Gracias por toda la ayuda que me habéis prestado y por la paciencia que habéis tenido conmigo. Sabéis muy bien que nunca habría podido leer esta tesis de no haber sido por vosotros, y os estaré eternamente agradecido por ello. En segundo lugar, con Alberto Requena, iba a decir mi profesor pero prefiero decir mi maestro, de Química Física. ¡Cuántas cosas me has enseñado, y cuántas cosas he aprendido de tí! Que aunque parezca igual, no es lo mismo. Y en último lugar, con mi amada esposa Birgit y mi pequeño truhán Maxi, que han sufrido en sus propias carnes los agobios, las prisas y los cambios de humor, y que se merecen un doctorado a la paciencia y a la bondad. ¡No os hacéis una idea de cuánto os quiero!

Índice

AGRADECIMIENTOS	VII
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	XI
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los genes KIR	2
1.1.1. Nomenclatura	4
1.1.2. Estructura	4
1.2. Los ligandos de los genes KIR	5
1.2.1. Genes KIR inhibidores	5
1.2.2. Genes KIR activadores	6
1.3. Expresión y diversidad de los genes KIR	7
1.3.1. Polimorfismo alélico	8
1.3.2. Diversidad haplotípica	8
1.4. Contribución de la inmunogenética a los estudios antropológicos	9
1.5. Polimorfismo KIR y diversidad genética en poblaciones humanas	10
1.5.1. Naturaleza y función de las moléculas KIR	10
1.5.2. Diversidad de los genes KIR en las poblaciones humanas	11
1.5.3. Interpretación evolutiva: migración vs. selección	13
1.6. Genes KIR y trasplante hepático	14

2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos	17
3. RESULTADOS: ARTÍCULOS PUBLICADOS	19
3.1. Referencias y resúmenes	19
4. CONCLUSIONES	23
4.1. Artículo 1	23
4.2. Artículo 2	24
4.3. Artículo 3	24
BIBLIOGRAFÍA	26

Producción Científica

Además de los artículos incluidos en esta tesis doctoral, aquí se lista el resto de la producción científica del doctorando publicada en revistas indexadas en PubMed hasta la fecha, contabilizando un total de 25 artículos.

1. Morales, R., Bolarín, J. M., Muro, M., & Legaz, I. (2023). Presence of KIR2DL2/S2, KIR2DL5, and KIR3DL1 molecules in liver transplant recipients with alcoholic cirrhosis could be implicated in death by graft failure. *Diagnostics*, aceptado para publicación.
2. Legaz, I., Bolarín, J. M., Campillo, J. A., Moya-Quiles, M. R., Miras, M., Muro, M., Minguela, A., & Álvarez-López, M. R. (2022). Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) and Human Leucocyte Antigen C (HLA-C) Increase the Risk of Long-Term Chronic Liver Graft Rejection. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(20), 12155. <https://doi.org/10.3390/ijms232012155>
3. Gúzman, S., Caccia, M., Cortés, O., Bolarin, J. M., Requena, A., Garcia-Godoy, A., Garcia-Godoy, F., & Boj, J. R. (2022). Human root dentin microhardness and degradation by triple antibiotic paste and calcium hydroxide. *American Journal of Dentistry*, *35*(4), 205-211.
4. Garcia-Villanueva, C., Milla, E., Bolarin, J. M., García-Medina, J. J., Cruz-Espinosa, J., Benítez-Del-Castillo, J., Salgado-Borges, J., Hernández-Martínez, F. J., Bendala-Tufanisco, E., Andrés-Blasco, I., Gallego-Martinez, A., Zanón-Moreno, V. C., & Pinazo-Durán, M. D. (2022). Impact of Systemic Comorbidities on Ocular Hypertension and Open-Angle Glaucoma, in a Population from Spain and Portugal. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(19), 5649. <https://doi.org/10.3390/jcm11195649>
5. Legaz, I., Bolarín, J. M., Navarro, E., Campillo, J. A., Moya, R., Pérez-Cárceles, M. D., Luna, A., Osuna, E., Miras, M., Muro, M., Minguela, A., & Alvarez López, R. (2021). KIR2DL2/S2 and KIR2DS5 in alcoholic cirrhotic patients undergoing liver transplantation. *Archives of Medical Science: AMS*, *17*(3), 764-774. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.84410>
6. Legaz, I., Bolarin, J. M., Campillo, J. A., Moya, R. M., Luna, A., Osuna, E., Minguela, A., Sanchez-Bueno, F., Alvarez, M. R., & Muro, M. (2021). Pretransplant ascites and encephalopathy and their influence on survival and liver graft rejection in alcoholic cirrhosis disease. *Archives of Medical Science: AMS*, *17*(3), 682-693. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.80651>

7. Raga-Cervera, J., Bolarin, J. M., Millan, J. M., Garcia-Medina, J. J., Pedrola, L., Abellán-Abenza, J., Valero-Vello, M., Sanz-González, S. M., O'Connor, J. E., Galarreta-Mira, D., Bendala-Tufanisco, E., Mayordomo-Febrer, A., Pinazo-Durán, M. D., & Zanón-Moreno, V. (2021). miRNAs and Genes Involved in the Interplay between Ocular Hypertension and Primary Open-Angle Glaucoma. Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis Networks. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(11), 2227. <https://doi.org/10.3390/jcm10112227>
8. Pinazo-Durán, M. D., García-Medina, J. J., Bolarín, J. M., Sanz-González, S. M., Valero-Vello, M., Abellán-Abenza, J., Zanón-Moreno, V., & Moreno-Montañés, J. (2020). Computational Analysis of Clinical and Molecular Markers and New Theranostic Possibilities in Primary Open-Angle Glaucoma. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(9), 3032. <https://doi.org/10.3390/jcm9093032>
9. Velázquez-Blázquez, J. S., Bolarín, J. M., Cavas-Martínez, F., & Alió, J. L. (2020). EM-KLAS: A New Automatic Scoring System for Early and Mild Keratoconus Detection. *Translational Vision Science & Technology*, *9*(2), 30. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.2.30>
10. Gimeno, L., Martínez-Banaclocha, H., Bernardo, M. V., Bolarin, J. M., Marín, L., López-Hernández, R., López-Alvarez, M. R., Moya-Quiles, M. R., Muro, M., Frias-Iniesta, J. F., Martínez-Escribano, J., Alvarez-López, M. R., Minguela, A., & Campillo, J. A. (2019). NKG2D Polymorphism in Melanoma Patients from Southeastern Spain. *Cancers*, *11*(4), 438. <https://doi.org/10.3390/cancers11040438>
11. Legaz, I., Navarro Noguera, E., Bolarín, J. M., Campillo, J. A., Moya, R., Luna, A., Miras, M., Minguela, A., Álvarez-López, M. R., & Muro, M. (2019). Patient Sex in the Setting of Liver Transplant in Alcoholic Liver Disease. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, *17*(3), 355-362. <https://doi.org/10.6002/ect.2017.0302>
12. Boix, F., Bolarín, J. M., Mrowiec, A., Eguía, J., Gonzalez-Martinez, G., de la Peña, J., Galian, J. A., Alfaro, R., Moya-Quiles, M. R., Legaz, I., Campillo, J. A., Ramírez, P., García-Alonso, A., Pons, J. A., Sánchez-Bueno, F., Minguela, A., Llorente, S., & Muro, M. (2017). CD28 biomarker quantification and expression level profiles in CD4+ T-lymphocytes in solid organ transplantation. *Transplant Immunology*, *42*, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2017.04.001>
13. Boix-Giner, F., Millan, O., San Segundo, D., Muñoz-Cacho, P., Mancebo, E., Llorente, S., Rafael-Valdivia, L., Rimola, A., Fábrega, E., Mrowiec, A., Allende, L., Minguela, A., Bolarín, J. M., Paz-Artal, E., López-Hoyos, M., Brunet, M., & Muro, M. (2016). High frequency of central memory regulatory T cells allows detection of liver recipients at risk of early acute rejection within the first month after transplantation. *International Immunology*, *28*(2), 55-64. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv048>
14. Boix, F., Millan, O., San Segundo, D., Mancebo, E., Rimola, A., Fabrega, E., Fortuna, V., Mrowiec, A., Castro-Panete, M. J., Peña, J. de la, Llorente, S., Minguela, A., Bolarin, J. M., Paz-Artal, E., Lopez-Hoyos, M., Brunet, M., & Muro, M. (2016). High expression of CD38,

- CD69, CD95 and CD154 biomarkers in cultured peripheral T lymphocytes correlates with an increased risk of acute rejection in liver allograft recipients. *Immunobiology*, 221(5), 595-603. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.01.008>
15. Boix, F., Bolarín, J. M., Eguía, J., Gonzalez-Martinez, G., De La Peña, J., Galian, J. A., Hernández-Martínez, A. M., Moya-Quiles, M. R., Legaz, I., Campillo, J. A., Ramirez, P., Sanchez-Bueno, F., García-Alonso, A. M., Pons, J. A., Minguela, A., Llorente, S., & Muro, M. (2016). Pretransplant CD28 Biomarker (Levels of Expression and Quantification of Molecules per Cell) in Peripheral CD4+ T Cells Predicts Acute Rejection Episodes in Liver and Kidney Recipients. *Transplantation Proceedings*, 48(9), 2987-2989. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2016.09.028>
 16. Martínez-Sánchez, M. V., Periago, A., Legaz, I., Gimeno, L., Mrowiec, A., Montes-Barqueros, N. R., Campillo, J. A., Bolarin, J. M., Bernardo, M. V., López-Álvarez, M. R., González, C., García-Garay, M. C., Muro, M., Cabañas-Perianes, V., Fuster, J. L., García-Alonso, A. M., Moraleda, J. M., Álvarez-Lopez, M. R., & Minguela, A. (2016). Overexpression of KIR inhibitory ligands (HLA-I) determines that immunosurveillance of myeloma depends on diverse and strong NK cell licensing. *Oncoimmunology*, 5(4), e1093721. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1093721>
 17. Legaz, I., Navarro-Noguera, E., Bolarín, J. M., García-Alonso, A. M., Luna Maldonado, A., Mrowiec, A., Campillo, J. A., Gimeno, L., Moya-Quiles, R., Álvarez-López, M. D. R., Minguela Puras, A., Miras, M., Sánchez-Bueno, F., & Muro, M. (2016). Epidemiology, Evolution, and Long-Term Survival of Alcoholic Cirrhosis Patients Submitted to Liver Transplantation in Southeastern Spain. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 40(4), 794-805. <https://doi.org/10.1111/acer.13013>
 18. Periago, A., Campillo, J. A., Mrowiec, A., Gimeno, L., Montes, N. R., Martínez-Sánchez, M. V., Cabañas-Perianes, V., García-Garay, C., Bolarin, J. M., Blasco-Mogorrón, A., Muro, M., Berenguer, M., Moraleda, J. M., García-Alonso, A. M., & Minguela, A. (2016). Circulating aberrant plasma cells allows risk stratification of patients with myeloma. *American Journal of Hematology*, 91(9), E353-E355. <https://doi.org/10.1002/ajh.24431>
 19. Campillo, J. A., López-Hernández, R., Martínez-Banaclocha, H., Bolarín, J. M., Gimeno, L., Mrowiec, A., López, M., Las Heras, B., Minguela, A., Moya-Quiles, M. R., Legaz, I., Frías-Iniesta, J. F., García-Alonso, A. M., Álvarez-López, M. R., Martínez-Escribano, J. A., & Muro, M. (2015). MHC class I chain-related gene a diversity in patients with cutaneous malignant melanoma from southeastern Spain. *Disease Markers*, 2015, 831864. <https://doi.org/10.1155/2015/831864>
 20. López-Hernández, R., Valdés, M., Campillo, J. A., Martínez-García, P., Salama, H., Bolarin, J. M., Martínez, H., Moya-Quiles, M. R., Minguela, A., Sánchez-Torres, A., Botella, C., Salgado, G., Miras, M., Carballo, F., & Muro, M. (2015). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene single-nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *International Journal of Immunogenetics*, 42(1), 38-45. <https://doi.org/10.1111/iji.12160>

21. Legaz, I., López-Álvarez, M. R., Campillo, J. A., Moya-Quiles, M. R., Bolarín, J. M., de la Peña, J., Salgado, G., Gimeno, L., García-Alonso, A. M., Muro, M., Miras, M., Alonso, C., Álvarez-López, M. R., & Minguela, A. (2013). KIR gene mismatching and KIR/C ligands in liver transplantation: Consequences for short-term liver allograft injury. *Transplantation*, *95*(8), 1037-1044. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318286486c>
22. Campillo, J. A., Legaz, I., López-Álvarez, M. R., Bolarín, J. M., Las Heras, B., Muro, M., Minguela, A., Moya-Quiles, M. R., Blanco-García, R., Martínez-Banaclocha, H., García-Alonso, A. M., Alvarez-López, M. R., & Martínez-Escribano, J. A. (2013). KIR gene variability in cutaneous malignant melanoma: Influence of KIR2D/HLA-C pairings on disease susceptibility and prognosis. *Immunogenetics*, *65*(5), 333-343. <https://doi.org/10.1007/s00251-013-0682-0>
23. Blanco-García, R. M., López-Álvarez, M. R., Garrido, I. P., Salgado-Cecilia, G., Campillo, J. A., Bolarín, J. M., Gimeno, L., Muro, M., García-Alonso, A. M., Martínez-Sánchez, M. V., Bernardo Pisa, M. V., Soriano-Díaz, S., Pascual-Figal, D. A., Alvarez-López, M. R., & Minguela, A. (2013). Post-transplant increase in soluble human leukocyte antigen-G associated with non-severe cardiac allograft vasculopathy. *Human Immunology*, *74*(3), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.12.001>
24. Muro, M., López-Álvarez, M. R., Campillo, J. A., Marin, L., Moya-Quiles, M. R., Bolarín, J. M., Botella, C., Salgado, G., Martínez, P., Sánchez-Bueno, F., López-Hernández, R., Boix, F., Bosch, A., Martínez, H., de la Peña-Moral, J. M., Pérez, N., Robles, R., García-Alonso, A. M., Minguela, A., Alvarez-López, M. R. (2012). Influence of human leukocyte antigen mismatching on rejection development and allograft survival in liver transplantation: Is the relevance of HLA-A locus matching being underestimated? *Transplant Immunology*, *26*(2-3), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.11.006>
25. Blanco-García, R. M., López-Álvarez, M. R., Garrido, I. P., Salgado-Cecilia, G., Campillo, J. A., Bolarín, J. M., Legaz, I., Muro, M., García-Alonso, A. M., Martínez-Sánchez, M. V., Moral, J. M. de la P., Pascual-Figal, D. A., Alvarez-López, M. R., Miras, M., & Minguela, A. (2011). CD28 and KIR2D receptors as sensors of the immune status in heart and liver transplantation. *Human Immunology*, *72*(10), 841-848. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.06.004>
26. López-Álvarez, M. R., Campillo, J. A., Legaz, I., Blanco-García, R. M., Salgado-Cecilia, G., Bolarín, J. M., Gimeno, L., Gil, J., García-Alonso, A. M., Muro, M., Alvarez-López, M. R., Miras, M., & Minguela, A. (2011). Divergences in KIR2D+ natural killer and KIR2D+CD8+ T-cell reconstitution following liver transplantation. *Human Immunology*, *72*(3), 229-237. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.12.015>

Resumen

Las células NK (*Natural killer*) son un componente fundamental de la inmunidad innata, formando una primera línea defensiva frente a infecciones, además de jugar un papel importante en la lucha contra células tumorales. Son capaces de lisar células infectadas o tumorales sin necesidad de que se haya producido una sensibilización previa y sin que intervenga el MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Su función está modulada por un balance entre varios receptores activadores e inhibidores, entre los que se encuentran los receptores KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptor*), glicoproteínas codificadas por una familia de genes en el cromosoma 19q13.4 que se expresan en la superficie de las células NK y en algunos subgrupos de células T, regulando su función mediante interacción con las moléculas HLA (*human leukocyte antigen*).

Múltiples estudios han evidenciado que los genes KIR, como mediadores de la respuesta inmune, juegan un papel en diversos aspectos del trasplante hepático, como el rechazo, la sepsis, o la recidiva de infecciones víricas, además de estar asociados a una mayor incidencia de ciertas formas de cáncer e infecciones víricas en enfermos de cirrosis alcohólica. Por otra parte, los genes KIR muestran un alto grado de polimorfismo, derivada de la evolución molecular forzada por la interacción con multitud de patógenos a lo largo de las generaciones, encontrándose correlación con las sucesivas migraciones humanas. Como resultado, las distintas poblaciones humanas muestran una gran variabilidad tanto a nivel genético como alélico, pudiendo ser de utilidad en estudios antropológicos.

Por todo ello, esta tesis pretende, contribuir a dilucidar el papel de los genes KIR en la evolución y desenlace del trasplante hepático y su interacción con otros factores, tanto clínicos como moleculares, que puedan intervenir, así como a enriquecer la información antropológica y epidemiológica asociada a los genes KIR en poblaciones caucásicas, para que sirva de utilidad en estudios de susceptibilidad clínica y de antropología forense.

Abstract

NK (Natural Killer) cells are a key component of innate immunity, forming a first line of defense against infections, as well as playing an important role in the fight against tumor cells. They are capable of lysing infected or tumoral cells without prior sensitization and without MHC (Major Histocompatibility Complex) involvement. Their function is modulated by a balance between several activating and inhibitory receptors, among which are the KIR receptors (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor), glycoproteins encoded by a family of genes on chromosome 19q13.4 that are expressed on the surface of NK cells and in some subgroups of T cells, regulating their function by interaction with HLA molecules (Human Leukocyte Antigen).

Multiple studies have shown that KIR genes, as mediators of the immune response, play a role in various aspects of liver transplantation, such as rejection, sepsis, or viral relapse, as well as being associated with a higher incidence of certain forms of cancer and viral infections in patients with alcoholic cirrhosis. On the other hand, KIR genes show a high degree of polymorphism, derived from the molecular evolution forced by the interaction with a multitude of pathogens throughout the generations, finding correlation with successive human migrations. As a result, different human populations show a great variability both at genetic and allelic level, which can be useful in anthropological studies.

Therefore, this thesis aims to contribute to elucidate the role of KIR genes in the evolution and outcome of liver transplantation and its interaction with other factors, both clinical and molecular, that may intervene, as well as to enrich the anthropological and epidemiological information associated with KIR genes in Caucasian populations, to be used in clinical susceptibility studies and forensic anthropology.

CAPÍTULO 1

Introducción

Ha transcurrido más de un siglo desde que Karl Landsteiner descubriese en el año 1900 los grupos sanguíneos ABO mediante ensayos de hemaglutinación [Owen 00], marcando el inicio del estudio de la variación genética humana mediante ensayos inmunogenéticos. A lo largo de la primera mitad del siglo XX el empleo de técnicas electroforéticas permitió el estudio de otros antígenos de los glóbulos rojos, además de alozimas [Mourant 76]. También se encontraron notables diferencias entre individuos para otras moléculas participantes en la respuesta inmunitaria, como las inmunoglobulinas, que presentan variación alotípica [Grubb 56, Steinberg 81], o los antígenos leucocitarios humanos (*Human Leucocyte Antigen*, HLA) [Dausset 58], que muestran un elevado grado de polimorfismo en la región de unión a péptidos. Los genes KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*) también presentan un complejo polimorfismo, tanto por los distintos alelos como en el número de genes presentes en cada individuo [Middleton 10b].

A día de hoy se conocen más de 350 patógenos en todo el mundo (*Gideon Online*, consultado en <http://www.gideononline.com> en abril de 2015), habiendo existido muchos más en la antigüedad y que están ya extintos. Y también cada año se producen epidemias estacionales de gripe, favorecidas por la alta mutabilidad del virus que la provoca. A la vista de esto, no debe sorprender el grado de polimorfismo alcanzado por los genes que codifican las moléculas involucradas en la respuesta inmunitaria, causado por la presión ejercida por multitud de agentes infecciosos que han favorecido la diversidad a través de la selección natural. Por ejemplo, los glóbulos rojos reconocen diversos patógenos mediante antígenos que actúan como receptores (como *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* o *Toxoplasma gondii*), por lo que juegan un papel importante en la susceptibilidad o la resistencia a enfermedades. En el caso de *P. vivax*, el alelo nulo se ha seleccionado en algunas regiones, pero no en otras, lo que permite a los glóbulos rojos escapar a la infección [Horuk 93]. Asimismo, la prevalencia de la heterocigosis ha podido contribuir a la diversidad alélica del HLA, ya que se sabe que algunos alelos de HLA están asociados a una mayor resistencia frente a enfermedades fatales, por ejemplo la asociación de HLA-B*27, HLA-B*51 y HLA-B*57 con una mejor prognosis del SIDA [Kawashima 09].

Por otra parte, al estudiar estos polimorfismos desde la perspectiva de la genética de poblaciones se ha observado que sus patrones de diversidad genética a nivel mundial tienden a mostrar cierta estructuración geográfica. Al realizar árboles filogenéticos se diferencian las poblaciones

de los distintos continentes, siendo la posición de África la principal controversia, ya que bien queda segregada junto a Europa formando un “grupo occidental” separado de un “grupo oriental” conformado por Asia, América y Oceanía [Cavalli-Sforza 99], o bien queda separada del resto de continentes [Cavalli-Sforza 94]. Esta observación indica que probablemente la selección natural no fue la única fuerza motriz de la evolución de los polimorfismos, sino que la historia de las migraciones humanas también contribuyó a su diversidad genética. De ahí el interés en utilizar estos sistemas inmunogenéticos como herramienta para reconstruir la historia de las poblaciones humanas. Ahora, tras muchas décadas recopilando información poblacional sobre estos polimorfismos y analizando su variación a diferentes escalas geográficas, podemos evaluar la trascendencia de estos estudios en la investigación antropológica.

Existen tres sistemas inmunogenéticos que han contribuido significativamente al estudio de las poblaciones humanas: el sistema de anticuerpos de la inmunoglobulina G (IgG), los antígenos HLA, y los receptores KIR. Representan el pasado (IgG), presente (HLA) y futuro (KIR) de este campo [Sanchez-Mazas 11a], debido a que se han empleado técnicas distintas de tipaje para analizarlos (serología para IgG, serología y tipaje molecular para HLA, y tipaje molecular para KIR), y a que el conocimiento sobre su diversidad en las poblaciones humanas está en distinto estado de desarrollo (exhaustivo para IgG, cada vez más completo para HLA, y en sus albores para KIR). Esta tesis se centra en el estudio de los genes KIR, que están fuertemente asociados funcionalmente con las moléculas HLA de clase I y presentan un amplio rango de genotipos, proporcionando información valiosa para dilucidar la historia y la geografía de los genes humanos, así como su salud [Cook 03, Toneva 01a, Uhrberg 02, Witt 99a].

1.1. LOS GENES KIR

Los receptores KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) pertenecen a la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig) que se expresan en la superficie de la mayoría de las células NK y en algunas de las células T de memoria y efectoras en humanos, e interaccionan con las moléculas HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de clase I. Además de en humanos, se encuentran en primates [Khakoo 00a] y en bóvidos [McQueen 02], pero parecen estar ausentes en roedores.

Las moléculas KIR son glicoproteínas de tipo I codificadas por una familia de genes altamente polimórficos y estrechamente relacionados que se encuentran en la región LRC (*Leukocyte Receptor Complex*) en el cromosoma 19q13.4 (Figura 1.1) [Baker 95, Dupont 97, Wende 99]. El LRC comprende alrededor de 1 Mb y contiene familias de genes que codifican receptores con dominios extracelulares tipo Ig [Canavez 01]. Los genes KIR se disponen secuencialmente, con una separación de 2 kb entre sí, conteniendo cada gen entre 10 y 16 kb [Wilson 00a], por lo que la familia completa ocupa unos 150 kb del LRC. Además de los loci KIR, el LRC incorpora genes que codifican otros miembros de la superfamilia de las Ig, como *ILT* (*Ig-like transcript*), *LAIR* (*leukocyte-associated Ig-like receptor*), *FcαR* (*Fc receptor for Ig A*) y el receptor de citotoxicidad natural NKp46. Los loci KIR están flanqueados por *ILT* en la parte centromérica y por *FcαR* en la telomérica.

Hasta el momento se han identificado 17 genes y pseudogenes KIR, incluyendo 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1, 3DP1

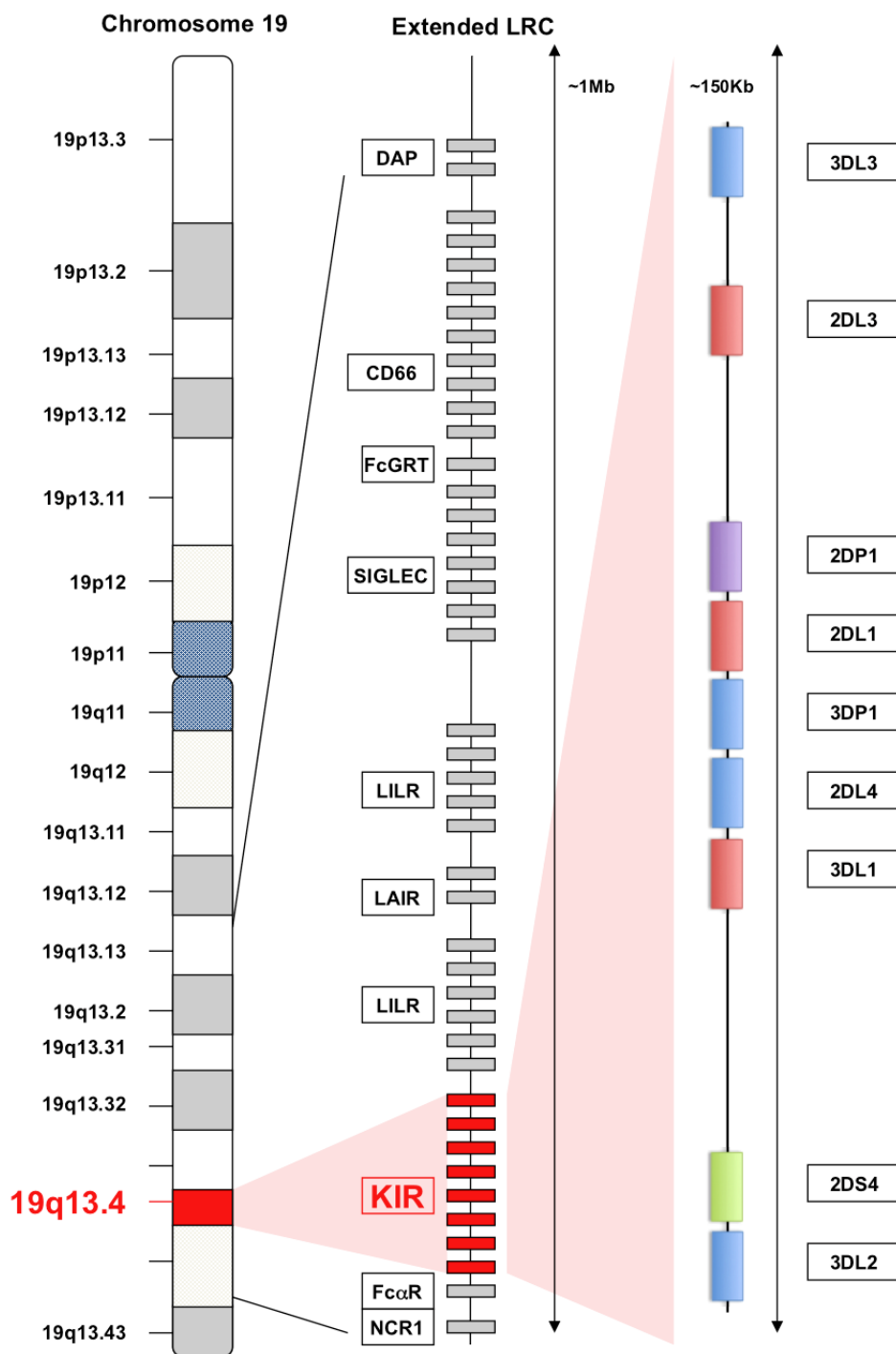


Figura 1.1 – La región LRC (*Leukocyte Receptor Complex*, complejo de receptores leucocitarios) es una región de ≈ 1 Mb de tamaño en el cromosoma 19q13.4, que contiene los genes *ILT* (*Ig-like transcript*), *LAIR* (*leukocyte-associated Ig-like receptor*), *KIR*, *FcαR* (*Fc receptor for Ig A*) y el receptor de citotoxicidad natural NKp46. Los genes 3DL3, 3DP1, 2DL4 y 3DL2 (en negro) son genes constitutivos, presentes en prácticamente todos los individuos [Borrego 02]. Fuente: IPD-KIR [Robinson 13].

KIR1D, que presentan hasta 601 alelos distintos (www.allelefrequencies.net, consultado el 19 de marzo de 2023). Cualquier secuencia KIR que difiera en más de un 2 % de la secuencia consenso aceptada para el gen será considerada como un alelo de dicho gen [Carrington 03b].

1.1.1. Nomenclatura

El HGNC (*Human Genome Nomenclature Committee*) se encarga de asignar y aprobar la nomenclatura de los genes KIR. El nombre de cada gen depende de la estructura de las moléculas que codifican, comenzando con el acrónimo KIR seguido de un sufijo que describe a la dicha molécula. El número de dominios Ig extracelulares se indica con 2D para dos dominios o 3D para tres dominios. Las letras S o L indican si tienen una cadena citoplasmática corta (*Short*) o larga (*Long*) en la región intracelular, y P si se trata de un pseudogén. Finalmente, un código numérico indica el alelo que codifica la proteína con la estructura descrita.

Existen dos tipos de moléculas KIR: las inhibidoras y las activadoras. Aquellas con cadenas citoplasmáticas larga L poseen dos dominios ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-Based Motif*) capaces de transmitir señales inhibidoras [Long 99]. Por el contrario, las que poseen cadenas citoplasmáticas cortas S carecen de dichos dominios ITIM, teniendo en su lugar residuos aminoácidos transmembrana cargados, que interactúan con proteínas activadoras del ciclo citotóxico celular [Vivier 97].

KIR2DS1 es un ejemplo de receptor activador que contiene dos dominios Ig y una cadena citoplasmática corta, mientras que KIR3DL1 es un receptor inhibidor con tres dominios Ig y una cadena citoplasmática larga. 2DL4 es un receptor inusual, ya que posee propiedades tanto activadoras como inhibidoras, al poseer dos dominios extracelulares Ig y una cadena larga que contiene un único ITIM, así como residuos transmembrana cargados. Los genes KIR2DP1 y 3DP1 se consideran pseudogenes o genes silenciosos porque no se suele detectar su RNA en las células mononucleadas de la sangre periférica [Wilson 00a].

1.1.2. Estructura

Los exones que codifican cada dominio de la molécula KIR se disponen como sigue: los primeros dos exones codifican el péptido transmisor; los exones 3-5 cada uno de los tres dominios Ig (D0, D1 y D2, respectivamente), los exones 6 y 7 la región de unión y a región transmembrana, respectivamente; y los dos últimos exones codifican la cola citoplasmática.

KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 y todos los genes 2DS son genes tipo 1, y poseen una organización similar a KIR3D, codificando moléculas KIR con tres dominios Ig. Sin embargo, el exón 3 es un pseudoexón que se elimina por *splicing*, produciendo por tanto una proteína que carece del dominio D0. KIR2DL4 y 2DL5 son genes de tipo 2, que carecen de exón 4 y que generan proteínas sin dominio D1. KIR3DL3 es similar a otros genes KIR3D, pero carece del exón 6.

El pseudogén KIR2DP1 posee una estructura similar a los genes tipo 1, pero carece de los exones 6, 7, 8 y 9. Algunos alelos de KIR3DP1 carecen del exón 2 además de los exones

6-9, mientras que otros contienen los exones 1-6. Estos últimos producirían proteínas incapaces de funcionar como receptores de membrana, pudiéndose secretar al medio extracelular [Gomez-Lozano 02].

1.2. LOS LIGANDOS DE LOS GENES KIR

Las moléculas HLA de clase I, tanto clásicas como no clásicas, son los ligandos más importantes de los genes KIR. Estas moléculas participan en la defensa adaptativa anti-patogénica presentando péptidos a las células efectoras del sistema inmune. Los receptores KIR presentan especificidad hacia HLA tanto a nivel de locus como de alelo [Lanier 96], aunque la expresión de KIR no se ve modulada por los ligandos HLA de clase I, al estar segregados en dos cromosomas distintos [Becker 03]. Sin embargo, se ha comprobado que las moléculas HLA de clase I pueden educar a las células NK [Johansson 05].

1.2.1. Genes KIR inhibidores

Los ligandos más importantes de los KIR inhibidores son las moléculas HLA-C. Se dividen en dos grupos, en función del aminoácido de la posición 80 de la hélice $\alpha 1$ de la molécula HLA. KIR2DL2 y 2DL3 interactúan directamente con los alotipos HLA-C del grupo 1, que incluyen C*01, *03, *07, *08, *12, *13, *14, *15:07 y *16:01, caracterizados por la presencia de asparagina en la posición 80 (Asn80). KIR2DL1 interactúa con los alotipos HLA-C del grupo 2, que incluyen C*02, *04, *05, *06, *07:07, *12:04, *15, *16:02 y *17, caracterizados por la presencia de lisina en posición 80 (Lys80) [Colonna 95a, Moretta 93]. Se conoce la estructura cristalina de la interacción entre las moléculas HLA-C y algunos genes KIR, como 2DL1 [Fan 97], 2DL2 [Boyington 01, Snyder 99], y 2DL3 [Maenaka 99]. La molécula KIR interacciona mediante los dominios D1 y D2 directamente con las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del HLA-C, así como al péptido al que se encuentra unido, que también juega un papel importante en la interacción con KIR [Boyington 01, Mandelboim 97, Young 02].

Existen más alelos HLA que receptores KIR, y el mismo receptor KIR puede reconocer varios alelos HLA, al reconocer los residuos que se conservan dentro de las regiones polimórficas. La especificidad de KIR frente a determinados alotipos de HLA dependen del residuo en la posición 44 [Boyington 01]. KIR2DL1, que tiene metionina (Met) en posición 44, reconoce los alotipos con lisina (Lys) en posición 80, mientras que KIR2DL2, que tiene lisina (Lys) en posición 44, no reconoce las moléculas HLA-C con lisina en posición 80. Por el contrario, reconoce aquellas con asparagina (Asn) en posición 80.

KIR3DL1 reconoce específicamente a los alotipos HLA-Bw4 (Figura 1.2) [D'Andrea 95, Gumperz 95], caracterizados por un residuo de isoleucina (Ile) en posición 80. Los genes que expresan Bw4 incluyen HLA-B*13, *15:13, *15:16, *15:17, *27, *37, *38, *44, *47, *49, *51, *52, *53, *57, *58, *59, A*23, *24, *25, y *32. KIR3DL2 interactúa con algunos alotipos HLA-A, como *03 y *11 [Valiante 97a]. KIR2DL4, el único que posee características tanto inhibidoras

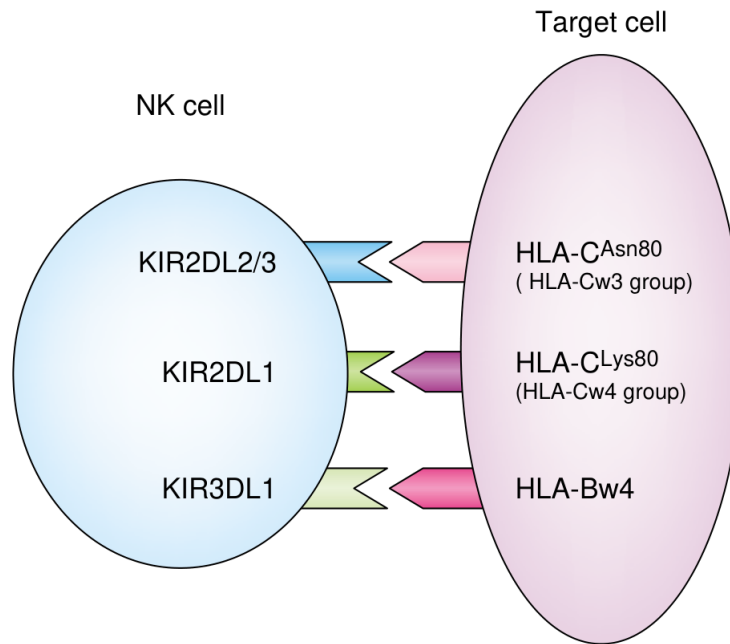


Figura 1.2 – Los receptores KIR inhibidores de las células NK reconocen las moléculas HLA de clase I en otras células. La ausencia de las moléculas HLA-C correspondientes en la célula diana induce la activación de la célula NK. KIR2DL2 y 2DL3 reconocen los alelos HLA-C caracterizados por Asn80, como Cw3. KIR2DL1 reconoce los caracterizados por Lys80, como Cw4. KIR3DL1 reconoce los alelos HLA que expresan el epítipo serológico Bw4. Fuente: IPD-KIR [Dupont 04].

como activadoras, reconoce probablemente HLA-G [Cantoni 98, Rajagopalan 99], que se expresan en trofoblastos humanos. Los ligandos de KIR2DL5 y KIR3DL3 se desconocen hasta el momento.

1.2.2. Genes KIR activadores

Al contrario de con los genes KIR inhibidores, aún se desconoce mucho sobre los ligandos específicos de los activadores. Aunque las secuencias extracelulares de ambos tipos de receptores son muy parecidas, sus ligandos aún no se han podido determinar con exactitud. Por ejemplo, aunque KIR3DS1 tiene un dominio de unión a péptidos muy similar al de KIR3DL1, no hay evidencias de que este receptor activador comparta la especificidad con Bw4 del inhibidor. Lo mismo ocurre con KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4 y 2DS5. Asimismo, los receptores activadores tienden a mostrar una menor afinidad por sus ligandos que los inhibidores [Vales-Gomez 99, Vales-Gomez 98]. Aunque KIR2DS1 y 2DS2 muestran *in vitro* cierta afinidad por HLA-C2 y HLA-C1 respectivamente, aún no se tiene evidencia del efecto fisiológico de esta unión. Se especula que los receptores activadores podrían ser específicos de HLA cuando los niveles de moléculas de clase I son altos, o que podrían reconocer moléculas distintas a las del HLA, como péptidos derivados de patógenos o antígenos virales [Lanier 01].

1.3. EXPRESIÓN Y DIVERSIDAD DE LOS GENES KIR

Tanto los genes KIR activadores como los inhibidores se expresan en las células NK y en algunos tipos de células T [Colonna 95b, Wagtmann 95]. Sus correspondientes receptores se expresan de manera clonal, regulando la expresión de cada gen, de manera que en cada clon se expresa un número determinado de receptores [Long 99, Valiante 97a]. El conjunto de receptores que se expresan depende principalmente del genotipo KIR, con poca o nula influencia del HLA [Miller 01, Shilling 02b], de forma que se puede expresar un KIR sin que esté presente su ligando HLA y viceversa. Los patrones de expresión de receptores KIR en un individuo son muy heterogéneos, variando tanto su número como su combinación, generando distintos subconjuntos de células NK con diferentes especificidades frente a HLA de clase I. Pese a ello, se ha propuesto la existencia de un proceso de educación que modifica la especificidad de las células NK al aparecer una nueva molécula de HLA de clase I [Johansson 05].

Lo mismo ocurre con las células T, que también muestran una distribución clonal en los patrones de expresión de sus receptores KIR [Vely 01]. Alrededor del 5% de las células T de memoria CD8+ en sangre periférica expresan genes KIR [Mingari 96]. Las moléculas KIR que se expresan en las células T pueden regular funciones como la secreción de citocinas y la citólisis celular [Mingari 98].

Todas las células NK de un individuo expresan al menos un gen KIR, y cada gen KIR se expresa en alguna célula NK. Los genes KIR inhibidores inducen tolerancia, mientras que los activadores contribuyen a la eliminación de células infectadas. Todos los genes del repertorio KIR de las células NK se expresan con excepción de los pseudogenes KIR3DP1, 2DP1 y probablemente 3DL3 [Valiante 97b]. Un proceso de selección, de mecanismo aún desconocido, garantiza que cada célula NK expresa al menos un gen inhibidor específico para las moléculas de HLA de clase I propias del individuo, pudiendo o no expresar un receptor activador.

La familia de genes KIR es muy diversa y evoluciona rápidamente. A nivel de haplotipo, presenta una considerable diversidad, tanto en términos de número de genes presentes y su distribución [Uhrberg 97, Wilson 00b, Yawata 02a], como de polimorfismo alélico para cada gen KIR [Gardiner 01, Rajalingam 01, Selvakumar 97, Shilling 98, Steffens 98], además de que cada célula NK de un mismo individuo tiene su propio repertorio de receptores KIR. Como consecuencia de todo ello, la probabilidad de que dos individuos no emparentados posean los mismos KIR es muy baja.

La diversidad genotípica o haplotípica, caracterizada por el conjunto de genes de un individuo, determina la respuesta específica de sus células NK, mientras que el polimorfismo alélico afecta generalmente a los niveles de expresión de un determinado KIR, y modifica el umbral de detección de las moléculas de HLA de clase I en las células diana [Uhrberg 05].

Hasta la fecha se ha determinado la secuencia genética de 110 perfiles KIR, y se han descrito muchos haplotipos derivados de estudios familiares [Carrington 03a]. Estas cifras se incrementan constantemente conforme se van estudiando más individuos y más familias.

1.3.1. Polimorfismo alélico

La mayoría de loci KIR tienen múltiples alelos, que presentan diferencias incluso en las regiones que codifican los residuos que afectan a la unión con las moléculas HLA. Hay tres pares de genes que se comportan como alelos, apareciendo en el mismo locus y en la misma posición en distintos haplotipos: KIR3DS1 y 3DL1 [Gardiner 01]; KIR2DL2 y 2DL3 [Crum 00, Witt 99b]; y KIR2DS4 y KIR1D [Hsu 02a]. Anteriormente se había sugerido que KIR2DS4 y 2DS1 podían ser alelos [Uhrberg 97], pero se comprobó que eran genes distintos que ocupaban loci diferentes [Norman 01, Wilson 00b]. KIR1D es una variante de 2DS4 que apareció como consecuencia de una deleción de 22 bp, provocando la pérdida del segundo dominio extracelular Ig (D2) [Hsu 02b]. Se denominó KIR1D por el alto grado de similitud que presentaba con la secuencia de aminoácidos del gen KIR1D del mono rhesus, pudiendo tratarse de ortólogos funcionales.

El polimorfismo alélico en los KIR se puede producir por recombinación desigual, duplicación, entrecruzamiento desigual, *splicing* alternativo, o mutaciones puntuales [Dohring 96, Khakoo 00b, Martin 04, Shilling 98]. Todos estos mecanismos contribuyen a la diversificación de los haplotipos KIR.

1.3.2. Diversidad haplotípica

Se han definido dos grupos de haplotipos KIR, denominados A y B, mediante genotipaje por PCR y análisis de RFLP (*restriction fragment length polymorfism*), que se diferencian por la presencia de un residuo HindIII de 24 kb al realizar una hibridación *Southern* [Uhrberg 97]. Un haplotipo se clasifica como tipo A si contiene los loci KIR2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1 y 3DP1. Estos haplotipos carecen de otro gen activador aparte del 2DS4, y aunque no varían en su contenido de genes, sí que lo hacen en la distribución alélicas que presentan [Shilling 02a].

Los haplotipos del grupo B, por el contrario, poseen más de un gen activador, incluyendo varias combinaciones de KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1 y 2DS4, pudiendo contener entre dos y cinco genes activadores. Los haplotipos de este grupo muestran mucha variabilidad en términos de número de genes, pero menor en términos de polimorfismo alélico que los del grupo A.

Pese a la notable variabilidad de los haplotipos KIR tanto en número de genes como en su combinación, hay tres bloques compartidos por todos ellos: KIR3DL3 en el extremo centromérico, KIR3DP1 (3DP1*00302 en los haplotipos A y 3DP1*002 en los B) y KIR2DL4 en la parte central de clúster de genes, y KIR3DL2 en el extremo telomérico. Se denominan genes estructurales o *framework genes*, y el número de genes KIR presentes entre éstos es variable [Wilson 00b].

Según un modelo alternativo, los haplotipos KIR están compuestos de dos mitades separadas, la parte centromérica que está flanqueada por KIR3DL3 y 2DL4, y la telomérica entre KIR2DL4 y 3DL2 [Hsu 02a]. La parte centromérica se caracteriza por la presencia de KIR2DL2 o 2DL3, pero no ambos, y casi nunca ninguno. Cuando 2DL2 está presente suele encontrarse apareado con 2DS2, mientras que 2DL3 suele aparearse con el trío 2DP1, 2DL1 y 3DP1 [Hsu 02b]. La

parte telomérica se caracteriza por la presencia de KIR3DL1 o 3DS1, siendo muy poco frecuente que no aparezca ninguno. Hay dos tipos de partes teloméricas, la corta y la larga, que incluyen combinaciones de genes KIR distintas. La parte telomérica corta está caracterizada por la presencia de KIR3DL1, conteniendo además 2DS1, 2DS4 o KIR1D, con 3DL2 en el extremo. Por el contrario, KIR3DS1 caracteriza la parte telomérica larga, incluyendo también 2DL5, junto a 2DS3 o 2DS5, y seguido por 2DS1, 2DS4 o KIR1D, terminando con KIR3DL2 [Hsu 02a]. La mayoría de los haplotipos investigados hasta la fecha encajan dentro de esta descripción, excepto algunos muy infrecuentes que podrían explicarse por fenómenos de recombinación, duplicación o inversión.

Por otro lado, el desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium* o LD) es la asociación no aleatoria de alelos en loci genéticamente relacionados. Algunos loci KIR están en fuerte desequilibrio de ligamiento, tanto en la parte telomérica como en la centromérica [Shilling 02b]. Por lo general, el desequilibrio es más fuerte cuando los loci KIR están muy próximos entre sí, por lo que es mucho mayor dentro de las regiones centromérica o telomérica que entre dichas regiones [Hsu 02a, Shilling 02a].

Al comparar distintas poblaciones humanas en términos de frecuencias de genes y haplotipos KIR se observa una alta especificidad y una considerable divergencia entre distintos grupos étnicos. La frecuencia relativa de haplotipos A y B es prácticamente la misma en todas las poblaciones caucásicas [Hsu 02a], mientras que en algunas poblaciones predomina el haplotipo A, como en los japoneses [Yawata 02a] o los coreanos [Whang 05], y en otras predomina el B, como entre los aborígenes australianos [Toneva 01b]. Una posible explicación para esta diversidad es que el ratio de haplotipos A y B se diferenció tras la separación geográfica de estas poblaciones y la subsecuente selección diferencial causada por los desafíos inmunológicos locales a los que se enfrentaron.

1.4. CONTRIBUCIÓN DE LA INMUNOGENÉTICA A LOS ESTUDIOS ANTROPOLÓGICOS

El sistema inmunogenético de los genes KIR representa una muy pequeña fracción del genoma humano, restringida a un único cromosoma, mientras que otros tipos de técnicas, como el estudio de microsatélites, los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), o las nuevas técnicas de secuenciación masiva de DNA proporcionan información del genoma al completo [Jakobsson 08, Rosenberg 02]. Por ello, el estudio de sistemas inmunogenéticos proporcionaría una información limitada de la diversidad genómica humana. A esto hay que añadir que los marcadores inmunogenéticos están sometidos a selección natural al jugar un papel instrumental de la respuesta inmunitaria, lo que en principio puede limitar su capacidad de reconstruir la historia de las poblaciones humanas modernas.

Sin embargo, el estudio de otros tipos de material genético restringido a una pequeña región del genoma, como el ADN mitocondrial o el cromosoma Y, han resultado muy útiles en la reconstrucción de la filogenia de la especie humana [Chiaroni 09, Ingman 00]. Además, la evolución no neutral del polimorfismo genético puede tornarse en una ventaja, al proporcionar información

complementaria de la evolución humana, como los cambios de adaptación ambiental. Del estudio de los sistemas inmunogenéticos (incluyendo KIR) se obtienen cinco conclusiones que son congruentes con las de otros marcadores genéticos [Sanchez-Mazas 11b].

1. La mayor parte de la diversidad genética es intra-poblacional, mientras que la diversidad inter-poblacional contribuye mínimamente. 2. La mayor diversidad genética se encuentra en las regiones del África oriental, lo que es compatible con la hipótesis sobre los orígenes humanos aceptada en la actualidad. 3. Los nativos de América y Oceanía presentan las menores tasas de polimorfismo. 4. Existe una fuerte relación entre variación genética y geografía. 5. Se encuentra paralelismo entre la diferenciación genética y la cultural, encontrándose correlación, por ejemplo, con las lenguas.

Por todo esto, los marcadores inmunogenéticos son una herramienta de utilidad antropológica, pese al efecto de la selección natural.

1.5. POLIMORFISMO KIR Y DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES HUMANAS

1.5.1. Naturaleza y función de las moléculas KIR

Las células NK son una parte fundamental del sistema inmunitario innato, constituyendo entre el 5% y el 15% del total de células mononucleadas en la sangre periférica [Blum 07], que pueden secretar citocinas y quimiocinas, así como acabar con células dañinas [Lanier 08]. Cuando la expresión de HLA de clase I se ve disminuida por infecciones víricas o transformaciones celulares malignas, las células pueden volverse resistentes frente a la histólisis por linfocitos T citotóxicos. Pero estos niveles de expresión aberrantes de moléculas de clase I pueden a su vez inducir que las células NK las destruyan espontáneamente, hipótesis que se denominó *missing-self* o pérdida de lo propio [Ljunggren 90]. Las células sanas no se ven atacadas porque expresan el ligando apropiado para un receptor inhibitor que porta la célula NK. Al contrario de lo que ocurre con los linfocitos T citotóxicos, las células NK usan un amplio espectro de receptores que pueden inducir señales activadoras o inhibitoras. La combinación de ambas señales determina el comportamiento de la célula NK [Lanier 05].

En humanos, la función de las células NK viene determinada por una familia de receptores polimórficos denominados KIR que se encuentra en el complejo de receptores leucocitarios, en el cromosoma 19q13.4 [Vilches 02]. Se han identificado 14 receptores KIR, que inducen inhibición (3DL1-3, 2DL1-3, 2DL5) o activación (3DS1, 2DS1-5) de la respuesta inmunitaria, o incluso una mezcla de ambas (2DL4). El HLA-C es el principal ligando de los receptores KIR inhibitorios [Colonna 97]. 3DL1 se liga con el epítipo serológico Bw4, que está presente en el 40% de los alotipos HLA-B y en algunos HLA-A (HLA-A23, -A24, -A25 y A32) [Thananchai 07]. Se ha demostrado que KIR3DL2 reconoce algunos alotipos HLA-A (HLA-A3 y -A11), aunque aún no se conocen las interacciones específicas de este receptor [Pende 96]. 2DL4 liga a HLA-G, que son moléculas no clásicas de clase I específicas de trofoblastos, induciendo la producción de interferón γ [Moffett-King 02].

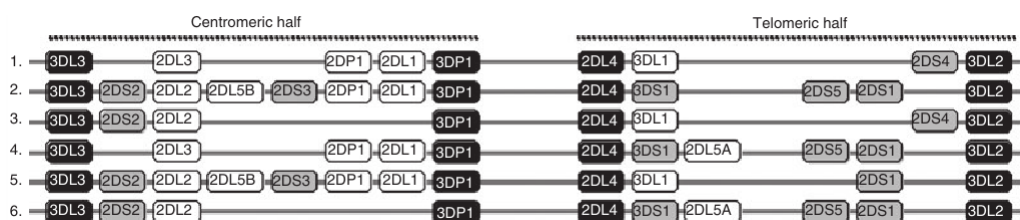


Figura 1.3 – Los haplotipos KIR tienen un contenido de genes muy variable. La figura muestra 6 haplotipos KIR. El 1 pertenece al grupo A, los restantes son del grupo B. Los genes *framework* se representan con fondo negro, los activadores en gris, y los inhibidores en blanco. KIR2DP1 y KIR3DP1 son pseudogenes que no codifican ningún receptor funcional.

Los genes KIR que están presentes en cada haplotipo son sustancialmente diferentes (Figura 1.3). A día de hoy se conocen más de 30 haplotipos KIR distintos [Hsu 02a], que se clasifican en dos grupos, A y B. Cuatro de los genes KIR están presentes en todos los haplotipos (KIR2DL4, 3DL2, 3DL3 y 3DP1), y se denominan genes *framework* o constitutivos [Wilson 00b]. Los haplotipos del grupo A tienen un contenido fijo de genes (KIR3DL3, 2DL3, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 2DS4 y 3DL2), aunque también muestran diversidad ya que cada gen puede estar representado por alelos distintos. Los haplotipos del grupo B, por el contrario, tienen un contenido genético variable, incluyendo distintos genes y alelos, algunos de los cuales no se encuentran en los del grupo A. Por tanto, los del grupo B suelen codificar más KIR activadores que los del A, que tan solo codifican un receptor activador, KIR2DS4. Los individuos homocigotos para haplotipos del grupo A solo poseen siete genes KIR funcionales, mientras que los heterocigotos con un haplotipo A y otro B pueden llegar a poseer los 14 genes KIR funcionales.

La función de los genes KIR inhibidores depende de la presencia de su ligando específico HLA de clase I. Tanto los genes KIR (en el cromosoma 19q13.4) como los genes HLA (en el 6p21.3) son altamente polimórficos, por lo que la segregación independiente de estas dos familias de genes no ligados producen una gran diversidad tanto en el número como en el tipo de los pares KIR-HLA.

Además de la diversidad haplotípica, cada gen KIR muestra un considerable polimorfismo alélico. Hasta el momento se han depositado más de 1500 secuencias KIR en las bases de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) y de IPD-KIR (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>). Los genes KIR inhibidores suelen ser más polimórficos que los activadores. Como las secuencias de los distintos genes KIR son muy parecidas es habitual encontrar fenómenos de recombinación, dando lugar a la duplicación de genes en el mismo haplotipo [Williams 03] o a su supresión, incluso con los genes constitutivos [Traherne 10].

1.5.2. Diversidad de los genes KIR en las poblaciones humanas

Los estudios realizados hasta la fecha de los KIR en distintas poblaciones humanas parecen indicar en el caso de los genes activadores que la variabilidad inter- e intra-poblacional se debe principalmente al número de genes presentes, más que a su diversidad alélica. Por el contrario,

aunque la mayoría de personas portan los mismos genes KIR inhibidores, se encuentra un considerable polimorfismo alélico en estos loci. La combinación de polimorfismo alélico y variación en número de genes portados hace que dos individuos no emparentados casi siempre tengan distinto genotipo KIR. Además, como los receptores KIR se expresan clonalmente en las células NK, cada una expresará sólo una porción de los genes de su perfil genético [Valiante 97a]. Este grado de diversidad refleja probablemente la presión selectiva de los patógenos sobre la respuesta de las células NK humanas.

Todas las poblaciones humanas estudiadas poseen haplotipos tanto del grupo A como del B, aunque sus frecuencias varían considerablemente [Ashouri 09, Single 07, Yawata 02a]. A nivel mundial, alrededor del 30% de las personas son homocigotos para el haplotipo A, aunque su frecuencia haplotípica varía entre un 8% y un 80%. Esta variación haplotípica hace que hasta la fecha se conozcan más de 600 genotipos KIR distintos en todo el mundo (<http://www.allelefrequencies.net>). Sin embargo, la mayor parte de la diversidad encontrada se debe a variaciones en la frecuencia de haplotipos comunes. Al estudiar los haplotipos KIR a nivel mundial se deduce que alrededor del 85% del contenido genético total se puede explicar con los seis haplotipos de la figura 1.3 [Hollenbach 10], aunque existen notables excepciones, como algunas poblaciones en África y Oceanía [Denis 05, Single 08], donde se aprecia una considerable diversidad en el haplotipo B más allá de los representados en la figura 1.3.

Se ha encontrado una relación entre las migraciones humanas prehistóricas y los dos grupos de haplotipos KIR al realizar un estudio comparativo de varias poblaciones de todo el mundo [Yawata 02a]. Los pueblos de América [Ewerton 07, Gendzekhadze 06], Australia [Toneva 01b] e India [Kulkarni 08, Rajalingam 08, Rajalingam 02], que tienen una larga historia de migraciones, portan una alta frecuencia de haplotipos B. Probablemente, estos pueblos adquirieron genes activadores para poder enfrentarse a los retos ambientales durante sus migraciones desde África [Rajalingam 08]. Por el contrario, los pueblos del noreste de Asia, incluyendo China, Japón y Corea, que se asentaron en latitudes con una temperatura más moderada y con menores cambios entre verano e invierno, poseen solo haplotipos del grupo A, que expresan un único gen KIR activador, y en ocasiones ninguno [Jiang 05, Whang 05, Yawata 02b]. Los Africanos y los Europeos presentan la misma proporción de haplotipos A y B, lo que sugiere una selección balanceada.

En casi la totalidad de poblaciones estudiadas hasta la fecha se ha encontrado un fuerte desequilibrio de ligamiento entre todos los genes KIR que se encuentran en la misma región cromosómica, tanto en la porción centromérica como en la telomérica (que están separadas por los genes KIR3DP1 y KIR2DL4) [Gourraud 10]. Por ejemplo, considerando todas las poblaciones estudiadas en *15th International Histocompatibility and Immunogenetics Workshop* [Hollenbach 10], el LD promedio entre los loci centroméricos KIR2DL2 y KIR2DS2 de haplotipo B era casi completo ($W_n = 0.99$). De la misma manera, los loci teloméricos de haplotipo B KIR3DS1 y KIR2DS1 están también en situación de fuerte desequilibrio ($W_n = 0.92$). Por el contrario, se observa un desequilibrio mucho menor cuando uno de los loci es centromérico y el otro telomérico. Por ejemplo, el LD entre KIR2DL2 y KIR3DS1 es muy bajo ($W_n = 0.10$).

Las regiones centromérica y telomérica del clúster KIR se distribuyen heterogéneamente a nivel mundial. La parte centromérica de los haplotipos A (caracterizados por la presencia de

KIR2DL3, 2DP1 y 2DL1) tiene una frecuencia de entre 50 % y 60 %, parecida a la del haplotipo completo A. Las poblaciones del este de Asia son una excepción [Single 08, Yawata 02b, Zhu 10], ya que presentan frecuencias muy bajas de la parte centromérica de haplotipos B (caracterizados por la presencia de KIR2DL2 y 2DS2), mientras que los haplotipos Cen-A superan el 80 % de frecuencia, y en general el haplotipo A completo suele ser también más habitual. Resulta interesante que estas altas frecuencias de Cen-A no se observan en las poblaciones amerindias [Hollenbach 10], lo que indicaría que su aumento en la región de Asia oriental se produjo tras la diferenciación de los pueblos amerindios.

El fragmento haplotípico Cen-B1, caracterizado por la presencia de KIR2DL2, 2DS2, 2DL5, 2DS3/S5, 2DP1 y 2DL1, es muy frecuente en África [Hollenbach 10, Hou 10, Single 07], mientras que el Cen-B2, mucho más corto y que cuenta con KIR2DL2 y 2DS2 además de los genes constitutivos, es mucho más frecuente fuera de África, aunque no se aprecia un gradiente asociado a esta diferencia, apareciendo de manera esporádica en distintas regiones del mundo. Por lo general, las poblaciones africanas presentan una diversidad haplotípica a nivel de KIR centroméricos que las de otros continentes.

La parte telomérica de los KIR está íntimamente relacionada con la demografía de las poblaciones. La frecuencia del gen KIR activador 3DS1 es muy baja en África [Hollenbach 10, Norman 07], y crece proporcionalmente a la distancia con este continente [Single 07]. Aunque las poblaciones africanas presentan frecuencias muy altas para los loci de haplotipos B centroméricos, la frecuencia de los loci activadores de haplotipos B teloméricos es muy baja. Por el contrario, la frecuencia total de los haplotipos completos B es relativamente baja entre las poblaciones de Asia, y considerablemente alta entre poblaciones africanas. El resto de las regiones del mundo se mueven entre estas dos situaciones extremas. Resulta curioso que, pese a la variación que se aprecia, el nivel de heterocigosidad entre haplotipos A y B a nivel mundial es prácticamente el mismo, situándose alrededor del 44 %, sugiriendo la existencia de algún tipo de beneficio selectivo que mantiene las frecuencias de ambos haplotipos en equilibrio [Hollenbach 10].

Por último, es posible que KIR2DS3 y KIR2DS5 sean alelos de un locus duplicado, que puede aparecer tanto en la región centromérica, en la telomérica o en ambas regiones del haplotipo KIR [Ordóñez 08], pero las técnicas actuales de tipaje no permiten su distinción. En poblaciones africanas la frecuencia de KIR2DS5 es muy baja, al igual que el resto de genes del haplotipo B telomérico (KIR3DS1 y KIR2DS1). Por el contrario, KIR2DS5 está casi siempre presente entre los amerindios, independientemente de que esté en la región centromérica o en la telomérica, mientras que KIR2DS3 está casi ausente [Flores 07, Gendzekhadze 06, Hollenbach 10]. Resulta curioso que aunque KIR2DS3 está ausente en las poblaciones americanas su frecuencia en el este de Asia es moderada, lo que sugiere que la fijación del alelo KIR2DS5 se produjo durante la migración de estos grupos asiáticos hacia el nuevo mundo.

1.5.3. Interpretación evolutiva: migración vs. selección

Diversos meta-análisis a nivel mundial han puesto en evidencia la correlación geográfica del polimorfismo KIR [Middleton 10a, Middleton 08b, Middleton 03, Rajalingam 08]. Por ejemplo,

la frecuencia de genes KIR activadores e inhibidores (en términos de presencia o ausencia) asociados al haplotipo B presenta un claro gradiente entre poblaciones adyacentes [Middleton 08a]. Sin embargo, dicho gradiente no se observa al estudiar los genes inhibidores asociados al haplotipo A. Hay que tener en cuenta que estos meta-análisis no tienen en cuenta el contenido alélico, solo la presencia o ausencia de un gen KIR en particular, lo que podría explicar las diferencias encontradas entre los haplotipos A y B. De hecho, debido a las peculiaridades del polimorfismo alélico de cada grupo haplotípico, el contenido genético (presencia/ausencia) de los loci tipo B parece ser suficiente para discriminar entre poblaciones, mientras que para los tipo A es necesario realizar el tipaje de alelos [Middleton 08b]. A la vista de estos resultados, los genes KIR pueden ser marcadores útiles en el estudio antropológico, al igual que los anticuerpos IgG o los antígenos HLA, el mtDNA o el cromosoma Y, aunque es necesario profundizar en el estudio del polimorfismo alélico de estos genes.

La diversidad KIR ha sido moldeada por varias fuerzas selectivas, además de por factores demográficos y estocásticos, como el flujo genético o la deriva genética. Los receptores KIR activadores e inhibidores regulan la función de las células NK [Cheent 09], y se ha encontrado relación entre el contenido de estos genes e infecciones, cáncer, autoinmunidad, síndromes del embarazo, y rechazo de trasplantes, lo que indicaría que están bajo presión selectiva. Se ha propuesto que los genes involucrados tanto en la inmunidad innata como en la adquirida están sometidos a un proceso de selección equilibradora [Bernatchez 03, Ferrer-Admetlla 08, Garrigan 03], que en el caso de los genes KIR actúan tanto a nivel de gen como de haplotipo. Este fenómeno sería el responsable de la proporción equilibrada de los haplotipos A y B debido a su complementariedad funcional, asumiendo que A favorece la defensa inmune, mientras que B está orientado hacia la reproducción [Parham 08]. Varios estudios han demostrado que existe un mayor grado de polimorfismo del esperado en condiciones de neutralidad genética, tanto a nivel de gen como de haplotipo [Guinan 10, Yawata 06], de manera que la selección equilibradora mantiene un *pool* de haplotipos KIR con funcionalidades complementarias sobre el que puede operar la selección positiva.

Aunque hay consenso en que los genes KIR co-evolucionan simultáneamente con sus ligandos HLA [Guinan 10, Hao 05, Hollenbach 10, Single 07, Yawata 06], la asociación entre pares KIR y HLA varían considerablemente a lo largo del mundo.

1.6. GENES KIR Y TRASPLANTE HEPÁTICO

Los genes KIR juegan un papel destacado en la modulación de la respuesta inmune en el trasplante de órganos, y en particular en el caso del trasplante hepático, tal y como se muestra en diversos trabajos en los que el aspirante a doctor ha participado [Legaz 22, Legaz 21b, Legaz 13, Blanco-García 11, López-Álvarez 11].

En uno de estos trabajos [López-Álvarez 11] se observó que una recuperación tardía de las células NK que expresan KIR2D+ estaba asociada a la aparición de rechazo agudo en individuos con genotipos HLA C2/C2, mientras que para el resto de genotipos una recuperación temprana se correlacionaba con un mejor evolución del trasplante. En otro trabajo [Blanco-García 11] se

estudió cómo la monitorización de la expresión de los receptores CD28 y KIR2D en linfocitos T de sangre periférica, tanto trasplante hepático como cardíaco, podía ayudar a evaluar la correcta modulación de la inmunosupresión para equilibrar los riesgos de infección vírica y rechazo agudo. Por otra parte, también se ha estudiado cómo afecta la discordancia (*mismatch*) de genes KIR entre donante y receptor en el trasplante hepático a su evolución [Legaz 13], encontrándose que en general incrementa el riesgo de aparición de rechazo agudo, y en particular afecta a la supervivencia de los pacientes a corto plazo. Otro trabajo publicado en 2021 [Legaz 21b] muestra el papel antagónico de KIR2DL2 y KIR2DS5 en la evolución de los pacientes de cirrosis alcohólica sometidos a trasplante hepático, de manera que en individuos mayores de 54 años la presencia de KIR2DL2 está asociada con una menor frecuencia de cirrosis alcohólica, mientras que la presencia de KIR2DS5 promueve la aparición de procesos fibróticos, particularmente cuando no hay una infección vírica asociada. Por último, el artículo más reciente [Legaz 22] estudia la relación entre la aparición de rechazo crónico en pacientes sometidos a trasplante hepático y la interacción entre los genes KIR y sus ligandos HLA, tanto en los donantes como en los receptores. Se encontró que tanto los genes KIR del receptor y HLA-C del donante, como el *mismatch* entre los genes KIR activadores de donante y receptor aumentan el riesgo de rechazo crónico, mientras que la combinación de KIR2DS1 y KIR2DS4 con ligandos C1 afectan a la supervivencia del injerto a largo plazo.

Pese a la trascendencia que los genes KIR y sus ligandos tienen en el trasplante hepático, existen otros muchos factores más allá de los genéticos que influyen en su evolución y desenlace, tal y como muestra también la producción científica del candidato a doctor. Un artículo publicado en 2016 estudia la epidemiología, la evolución y la supervivencia a largo plazo de pacientes de cirrosis hepática sometidos a trasplante hepático en la Región de Murcia, encontrándose que la cirrosis es la principal causa de trasplante, y que aunque suele presentar muchas complicaciones pre-trasplante (como la ascitis o la encefalopatía), presenta pocas complicaciones post-trasplante y muestra buenos pronósticos y larga supervivencia de injerto. Sin embargo, si existe una infección vírica concomitante, la supervivencia desciende marcadamente. Posteriormente se estudió la influencia del género en el pronóstico y desenlace del trasplante hepático [Legaz 19], encontrándose que aunque la cirrosis alcohólica aparece con mayor frecuencia en hombres que en mujeres, presentan similares tasas de infecciones concomitantes, y que aunque las mujeres presentan mayores tasas de ascitis y encefalopatía, muestran luego menor probabilidad de rechazo agudo tras el trasplante. Se encontró también que las principales causas de muerte fueron el fallo del injerto, la sepsis, y el fallo multi-orgánico a largo plazo. En términos de supervivencia, otro trabajo publicado [Legaz 21a] mostró que, pese a los resultados anteriores, la supervivencia de los trasplantados no se ve afectada en términos de rechazo agudo o crónico por la ascitis ni por la encefalopatía, independientemente de si existe infección vírica o no. Por último, un trabajo recientemente aceptado para publicación [Morales 23] muestra un incremento en la frecuencia de muerte por fallo multiorgánico en trasplantados hepáticos con cirrosis alcohólica asociado a la presencia de los genes KIR2DL2/S2, KIR2DL5 y KIR3DL1, evidenciando la vulnerabilidad de los pacientes en el periodo inmediatamente posterior al trasplante.

De cualquier manera, el número de publicaciones en la literatura científica sobre las patologías hepáticas de origen alcohólico es limitado, y aún se desconocen cuáles son con exactitud las causas de muerte más frecuentes tras el trasplante hepático, siendo necesario realizar estudios

exhaustivos con cohortes más numerosas. Esta información es vital, ya que ha de servir como guía a las autoridades sanitarias en el diseño de las políticas de salud pública que permitan enfrentar el cada vez mayor consumo de alcohol, con un incremento particularmente significativo entre las mujeres. Por ello, esta tesis pretende contribuir a la determinación de las distintas causas clínicas y sociodemográficas que influyen en el riesgo de muerte de pacientes de cirrosis alcohólica, y en particular en su supervivencia a corto y largo plazo tras un trasplante hepático.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1. OBJETIVOS

Los receptores KIR juegan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria innata, modulando la función citotóxica de las células NK en combinación con las moléculas HLA de clase I. Los genes que los codifican presentan una gran diversidad, posiblemente debida a la presión selectiva causada por la exposición a distintos organismos patogénicos, considerándose que su evolución es análoga a la de los genes HLA. Cada vez hay más estudios revelando la relación entre los genes KIR y un amplio espectro de patologías, así como su participación en el resultado de distintos tipos de trasplante. A la vista de estas observaciones, se plantean la hipótesis de que la distribución de genes KIR en la población de Murcia vendrá moldeada por dos factores actuando de manera simultánea: por un lado, la presión selectiva de índole inmunológica a la que la población se ha visto sometida, y por otro al efecto de las migraciones a lo largo de la historia.

Por otra parte, múltiples investigaciones han mostrado también el importante papel que los genes KIR juegan en la aparición y el curso de patologías como el melanoma o el mieloma, así como en el trasplante hepático o el renal. Por tanto, considerando el papel clave de los genes KIR en la respuesta inmunitaria y su gran variabilidad geográfica, la correcta caracterización de sus distribuciones puede ayudar en la planificación de estudios epidemiológicos, así como ser de utilidad para la planificación de programas de salud pública.

Respecto al caso concreto del trasplante hepático en patologías asociadas al alcoholismo, aunque aparece alguna esporádica publicación en la literatura científica tratando el tema, existe un considerable desconocimiento sobre las causas exactas de muerte en estos pacientes debido a la carencia de estudios con muestras suficientemente grandes que permitan tomar medidas para prevenir la aparición prematura del éxitus. Resulta vital conocer la relación entre los factores clínicos y sociodemográficos asociados a las distintas causas de muerte y a la supervivencia a corto y largo plazo de los pacientes de cirrosis alcohólica sometidos a trasplante hepático, que permitan adoptar las medidas preventivas y definir procedimientos precisos de monitorización y seguimiento para adaptar los tratamientos, mejorando su calidad de vida y su supervivencia.

Por tanto, teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, los objetivos de los trabajos científicos publicados que se incluyen en esta tesis doctoral pretenden alcanzar los siguientes objetivos mediante el estudio tanto clínico como genético de individuos de la Región de Murcia:

1. Determinar la distribución de cada gen KIR y de los genotipos resultantes de su combinación, así como del desequilibrio de ligamiento existente entre ellos.
2. Estimar los haplotipos que conforman los genotipos encontrados, empleando técnicas estadísticas y un conjunto de haplotipos patrón preestablecido, frecuente en poblaciones caucásicas.
3. Comparar la distribución de genes, genotipos y haplotipos KIR, así como los patrones de desequilibrio de ligamiento, de la población de Murcia con otras de distintos lugares del mundo.
4. Determinar las principales causas de muerte, tanto súbitas como no súbitas, en pacientes que sufren cirrosis alcohólica y que se ven sometidos a un trasplante hepático, así como su supervivencia a corto y largo plazo.
5. Determinar la relación entre dichas causas de muerte y las supervivencias a corto y largo plazo, y diversos parámetros clínicos y sociodemográficos.

CAPÍTULO 3

Resultados: Artículos publicados

3.1. REFERENCIAS Y RESÚMENES

Artículo 1

- **Título:** Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) genes can be an adequate tool in forensic anthropological studies: evaluation in a wide Caucasian Spanish population.
- **Revista:** Australian Journal of Forensic Sciences 55(2):168-190 (2021)
- **Autores:** José Miguel Bolarín, María Dolores Pérez-Cárceles, Aurelio Luna, Alfredo Minguela, Manuel Muro, Isabel Legaz.
- **DOI:** 10.1080/00450618.2021.1930156
- **Web:** <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00450618.2021.1930156>
- **Abstract:** Most immune system polymorphisms have undergone molecular evolution largely due to natural selection driven primarily by host-pathogen interactions, showing significant human geographic expansion signs. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) show great genetic and allelic variation among different populations. The aim of this study was to analyse the frequency of KIR genes in a large cohort of healthy Spanish Caucasians (SC) to be able to compare them with other world populations. A total of 609 healthy SC unrelated individuals were analysed and compared with 16 worldwide populations. KIR genotyping was analysed by PCR-SSO technique. Our results showed that all KIR genes were present in the Spanish population. iKIR2D genes of the Spanish population were similar in different European populations like Danish, Finland, Irish and Italian populations, Czech and Turkish populations but very different to Australian, Bornean, Chinese, Indian, Venezuelan, and Russian populations. KIR3DL1 gene frequency in the Australian population was significantly lower than the Spanish population. aKIR genes frequencies of the Spanish population were similar to European populations, but slight differences were found in English, Finnish, Irish and Macedonian populations. In conclusion, our results enrich the Caucasian genetic information resources of the KIR gene pool for genetic susceptibility diseases and forensic anthropological studies.

Artículo 2

- **Título:** Forensic evaluation and population genetic study of KIR2DS4 insertion/deletion polymorphisms in a Spanish population.
- **Revista:** Romanian Journal of Legal Medicine 28(4):419-428 (2020)
- **Autores:** José Miguel Bolarín, María Dolores Pérez-Cárceles, Aurelio Luna, Alfredo Minguela, Manuel Muro, Isabel Legaz.
- **DOI:** 10.4323/rjlm.2020.419
- **Web:** <http://www.rjlm.ro/index.php/arhiv/839>
- **Abstract:** Polymorphisms (Indels) of insertion/deletion are a class of diallelic genetic markers resulting from a single mutation event and reflect the insertion or deletion of genomic DNA bases. The aim of this study was to analyze the distribution of the allelic variants of KIR2DS4 in the Spanish Caucasian population and compared it with other populations described in the literature. Genotyping of allelic variants of KIR2DS4 was performed by PCR-SSO in 127 healthy Spanish Caucasian individuals and were subsequently compared with 26 different world populations. A frequency of KIR2DS4-full (36.2%) allelic variants was found in the Spanish population, similar to those found European populations, but different and higher frequency in South and Central America and the Caribbean, Saudi Arabia, Sub-Saharan African as well as Hong Kong and Korean populations. A frequency of 77.2% of KIR2DS4-deleted variant was found in Spanish population, while lower percentages were found in Sub-Saharan Africa, China, Hong Kong and Korea. No differences in the distribution of KIR2DS4 variants were observed between AA/BX KIR haplotypes and genotypes. In conclusion, our results enrich the Caucasian genetic information of the KIR2DS4 allelic variants between the Spanish Caucasian and other populations that could be useful in clinical, forensic and anthropological studies.

Artículo 3

- **Título:** Causes of death and survival in alcoholic cirrhosis patients undergoing liver transplantation: Influence of the patient's clinical variables and transplant outcome complications.
- **Revista:** Diagnostics 11(6):968 (2021)
- **Autores:** José Miguel Bolarín, María Dolores Pérez-Cárceles, Juan Pedro Hernández del Rincón, Aurelio Luna, Alfredo Minguela, Manuel Muro, Isabel Legaz.
- **DOI:** 10.3390/diagnostics11060968
- **Web:** <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/6/968>

- **Abstract:** Background. Clinical and molecular mechanisms involved in the cause and time of death of alcoholic cirrhosis (AC) patients undergoing liver transplantation (LT) are not entirely understood. In sudden death cases, judicial autopsy practice is mandatory for determining the cause and circumstances of death. The medico-legal autopsy data are essential for helping health authorities to guide future public health activities, assess the effectiveness of health systems, and adopt the necessary preventive measures to improve and adapt the treatments in order to increase these patients' survival. Objective. Our study aimed to determine the different clinical and sociodemographic causes that influence the different causes of death and the short- and long-term survival of AC patients undergoing liver transplantation. Methods. A total of 122 deceased AC patients undergoing LT were analyzed at different times post-transplantation. The main pre- and post-transplant complications were analyzed in relation to the cause of death and the patient's survival, as well as the causes and time at which the patient's death occurred. Results. A total of 53.3% of non-sudden death was observed. A large number of the deaths of AC patients undergoing transplantation were due to non-sudden death, sepsis, and graft failure (GF), the main causes of death in the sample being similar in both sexes. In non-sudden deaths, there were no significant differences between the death rates either related or not related to the liver transplant. Sepsis was the main cause, with the highest percentage (21.3%) of mortality, followed by GF (18.9%) and multiorgan failure (15.6%) at ten years. Furthermore, our results showed how pre-transplant clinical complications, such as viral infections and encephalopathy, influence the age at which multiorgan failure occurs in the transplanted patient. Conclusion. Multiorgan failure is the leading cause of sudden death, with higher mortality during the first year after transplantation, followed by sepsis and GF. Our results show the vulnerability of AC patients, both in the hospital period after the transplant and outside.

CAPÍTULO 4

Conclusiones

4.1. ARTÍCULO 1

Muchos de los polimorfismos del sistema inmune han ido surgiendo tras las sucesivas exposiciones a lo largo del tiempo a multitud de patógenos, mientras las distintas poblaciones humanas migraban a lo largo del planeta. Esto queda también patente en los receptores KIR, que muestran una considerable variación entre las distintas poblaciones humanas, tanto a nivel alélico como haplotípico.

El objetivo de este trabajo es analizar la frecuencia de diferentes genes KIR en una cohorte numerosa de individuos españoles sanos de etnia caucásica y originarios de la región de Murcia, para caracterizar esta población genotípicamente, comparándola con otras poblaciones de distintas partes del mundo, de manera que pueda ser de utilidad en estudios antropológicos y forenses.

En total se estudiaron 609 individuos sanos sin parentesco, a los que se realizó el genotipaje de genes KIR utilizando la técnica PCR-SSO (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide*), comparándolos luego con otras 16 poblaciones de diversas etnias. Los resultados mostraron que todos los genes KIR conocidos estaban presentes en la muestra española estudiada, y que la distribución de los genes KIR2D inhibidores era similar a otras poblaciones europeas (daneses, finlandeses, irlandeses, italianos, checos y turcos), mientras que mostraban grandes diferencias con otras poblaciones de otras etnias o que estaban más alejadas geográficamente (aborígenes australianos, borneanos chinos, indios, venezolanos y rusos). Asimismo, la frecuencia del gen KIR3DL1 resultó ser significativamente menor en la población de aborígenes australianos. Respecto a los genes KIR activadores, su frecuencia resultó también similar a la de otras poblaciones europeas, pero se encontraron pequeñas diferencias respecto a poblaciones inglesas, finlandesas, irlandesas y macedonias.

En resumen, los resultados de este trabajo han servido para enriquecer la información genética disponible sobre los genes KIR para la población caucásica en general y española en particular, de manera que pueda usarse en estudios genéticos de susceptibilidad a enfermedades y de antropología forense.

4.2. ARTÍCULO 2

Los polimorfismos de inserción y deleción (*indels*) son un tipo de marcador genético dialélico que surge tras la inserción o eliminación de una única base en el DNA genómico. El objetivo de este estudio es analizar la distribución de las variantes alélicas del gen KIR2DS4 en una población caucásica española originaria de la región de Murcia y compararla con la de otras poblaciones mundiales descritas en la literatura científica.

El genotipaje de las variantes alélicas de KIR2DS4 se realizó sobre 127 individuos españoles sanos y no emparentados de etnia caucásica, comparándolos con otras 26 poblaciones de distintas etnias y de distintas partes del mundo. La frecuencia de la versión completa del gen (KIR2DS4-full) fue del 36.2%, similar a la de otras poblaciones europeas, pero mayor que las de otras poblaciones de América del sur y central, Caribe, Arabia Saudí, África subsahariana, Hong Kong y Corea. Respecto a la variante truncada (KIR2DS4-del), la frecuencia encontrada fue del 77.2%, mayor que las de poblaciones subsaharianas, de China, Hong Kong o Corea. No se encontraron diferencias en la distribución de las variantes de KIR2DS4 entre haplotipos y genotipos AA y BX en las distintas poblaciones.

En resumen, estos resultados sirven para enriquecer la información genética disponible sobre las variantes alélicas del gen KIR2DS4 en la población española y en poblaciones caucásicas en general, que puede ser de utilidad en estudios clínicos, antropológicos y forenses.

4.3. ARTÍCULO 3

Los mecanismos clínicos y moleculares involucrados en la causa y el momento de la muerte de pacientes de cirrosis alcohólica sometidos a trasplante hepático no se conocen aún con exactitud. En el caso particular de que se produzca una muerte súbita, la ley obliga a realizar una autopsia para estudiar las circunstancias y determinar su causa. El resultado de estas autopsias sirve como guía en la planificación de las políticas de salud y la determinación de la eficacia de los sistemas sanitarios, permitiendo adoptar las medidas preventivas necesarias para incrementar la esperanza de vida de los pacientes.

El objetivo de este estudio es determinar los distintos factores clínicos y sociodemográficos asociados a la supervivencia a corto y largo de los pacientes de cirrosis alcohólica sometidos a trasplante hepático, así como a las causas de muerte, en una cohorte de individuos de etnia caucásica procedentes de la región de Murcia. Se han estudiado un total de 122 pacientes con diversas complicaciones pre- y post-trasplante, haciéndoles un seguimiento en el tiempo, de los que el 55.3% sufrieron una muerte no súbita. Además de por este motivo, la mayoría de pacientes fallecieron debido a sepsis o fallo de injerto, sin que se apreciaran diferencias entre hombres y mujeres. Para las muertes no súbitas, no se encontraron diferencias entre las tasas de mortalidad asociadas o no directamente al trasplante hepático. Las principales causas de muerte a 10 años post-trasplante fueron la sepsis (21.3%), el fallo del injerto (18.9%) y el fallo multiorgánico (15.6%). Asimismo, se ha estudiado la relación entre el momento en que el fallo multiorgánico se produce y la manifestación de complicaciones en el trasplante, como las infecciones víricas

o la encefalopatía. Respecto a la muerte súbita, el fallo multiorgánico es la principal causa, apareciendo principalmente en el primer año tras el trasplante, seguida de la sepsis y el fallo del injerto.

En conclusión, en este trabajo se ha evidenciado la vulnerabilidad de los pacientes de cirrosis alcohólica, tanto durante su estancia hospitalaria tras el trasplante, como tras recibir el alta médica.

Bibliografía

- [Ashouri 09] E Ashouri, S Farjadian, E F Reed, A Ghaderi y R Rajalingam. *KIR gene content diversity in four Iranian populations*. Immunogenetics, vol. 61, no. 7, páginas 483–492, 2009.
- [Baker 95] M L Baker, L L Brockunier, J R Bagley, C P France y D J Carr. *Fentanyl-related 4-heteroanilido piperidine OHM3295 augments splenic natural killer activity and induces analgesia through opioid receptor pathways*. J Pharmacol Exp Ther, vol. 274, no. 3, páginas 1285–1292, 1995.
- [Becker 03] S Becker, T Tonn, T Fussel, M Uhrberg, M Bogdanow, E Seifried y C Seidl. *Assessment of killer cell immunoglobulinlike receptor expression and corresponding HLA class I phenotypes demonstrates heterogenous KIR expression independent of anticipated HLA class I ligands*. Hum Immunol, vol. 64, no. 2, páginas 183–193, 2003.
- [Bernatchez 03] L Bernatchez y C Landry. *MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?* J Evol Biol, vol. 16, no. 3, páginas 363–377, 2003.
- [Blanco-García 11] R. M. Blanco-García, M. R. López-Álvarez, I. P. Garrido, G. Salgado-Cecilia, J. A. Campillo, J. M. Bolarín, I. Legaz, M. Muro, A. M. García-Alonso, M. V. Martínez-Sánchez, J. M. de la Peña Moral, D. A. Pascual-Figal, M. R. Alvarez-López, M. Miras y A. Minguela. *CD28 and KIR2D receptors as sensors of the immune status in heart and liver transplantation*. Human Immunology, vol. 72, no. 10, páginas 841–848, October 2011.
- [Blum 07] K S Blum y R Pabst. *Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs?* Immunol Lett, vol. 108, no. 1, páginas 45–51, 2007.
- [Borrego 02] F Borrego, J Kabat, D K Kim, L Lieto, K Maasho, J Pena, R Solana y J E Coligan. *Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells*. Mol Immunol, vol. 38, no. 9, páginas 637–660, 2002.

- [Boyington 01] J C Boyington, A G Brooks y P D Sun. *Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules*. Immunol Rev, vol. 181, páginas 66–78, 2001.
- [Canavez 01] F Canavez, N T Young, L A Guethlein, R Rajalingam, S I Khakoo, B P Shum y P Parham. *Comparison of chimpanzee and human leukocyte Ig-like receptor genes reveals framework and rapidly evolving genes*. J Immunol, vol. 167, no. 10, páginas 5786–5794, 2001.
- [Cantoni 98] C Cantoni, S Verdiani, M Falco, A Pessino, M Cilli, R Conte, D Pende, M Ponte, M S Mikaelsson, L Moretta y R Biassoni. *p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily*. Eur J Immunol, vol. 28, no. 6, páginas 1980–1990, 1998.
- [Carrington 03a] M Carrington y P Norman. The KIR Gene Cluster. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 2003.
- [Carrington 03b] M Carrington y P Norman. The KIR Gene Cluster. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 2003.
- [Cavalli-Sforza 94] L L Cavalli-Sforza, P Menozzi y A Piazza. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press, 1994.
- [Cavalli-Sforza 99] L L Cavalli-Sforza y W F Bodmer. *The Genetics of Human Populations*. Dover Publications, 1999.
- [Cheent 09] K Cheent y S I Khakoo. *Natural killer cells: integrating diversity with function*. Immunology, vol. 126, no. 4, páginas 449–457, 2009.
- [Chiaroni 09] J Chiaroni, P A Underhill y L L Cavalli-Sforza. *Y chromosome diversity, human expansion, drift, and cultural evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 106, no. 48, páginas 20174–20179, 2009.
- [Colonna 95a] M Colonna y J Samaridis. *Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells*. Science, vol. 268, no. 5209, páginas 405–408, 1995.
- [Colonna 95b] M Colonna y J Samaridis. *Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells*. Science, vol. 268, no. 5209, páginas 405–408, 1995.
- [Colonna 97] M Colonna. *Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors*. Immunol Rev, vol. 155, páginas 127–133, 1997.
- [Cook 03] M A Cook, P A Moss y D C Briggs. *The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor loci in UK blood donors from three ethnic groups*. Eur J Immunogenet, vol. 30, no. 3, páginas 213–221, 2003.

- [Crum 00] K A Crum, S E Logue, M D Curran y D Middleton. *Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires*. Tissue Antigens, vol. 56, no. 4, páginas 313–326, 2000.
- [D'Andrea 95] A D'Andrea, C Chang, K Franz-Bacon, T McClanahan, J H Phillips y L L Lanier. *Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes*. J Immunol, vol. 155, no. 5, páginas 2306–2310, 1995.
- [Dausset 58] Jean Dausset. *Iso-leuco-anticorps*. Acta haematologica, vol. 20, no. 1-4, páginas 156–166, 1958.
- [Denis 05] L Denis, J Sivula, P A Gourraud, N Kerdudou, R Chout, C Ricard, J P Moisan, K Gagne, J Partanen y J D Bignon. *Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion*. Tissue Antigens, vol. 66, no. 4, páginas 267–276, 2005.
- [Dohring 96] C Dohring, J Samaridis y M Colonna. *Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors*. Immunogenetics, vol. 44, no. 3, páginas 227–230, 1996.
- [Dupont 97] B Dupont, A Selvakumar y U Steffens. *The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4*. Tissue Antigens, vol. 49, no. 6, páginas 557–563, 1997.
- [Dupont 04] B Dupont y K C Hsu. *Inhibitory killer Ig-like receptor genes and human leukocyte antigen class I ligands in haematopoietic stem cell transplantation*. Curr Opin Immunol, vol. 16, no. 5, páginas 634–643, 2004.
- [Ewerton 07] P D Ewerton, M Leite Mde, M Magalhaes, L Sena y E J Melo dos Santos. *Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles*. Immunogenetics, vol. 59, no. 8, páginas 625–630, 2007.
- [Fan 97] Q R Fan, L Mosyak, C C Winter, N Wagtmann, E O Long y D C Wiley. *Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors*. Nature, vol. 389, no. 6646, páginas 96–100, 1997.
- [Ferrer-Admetlla 08] A Ferrer-Admetlla, E Bosch, M Sikora, T Marques-Bonet, A Ramirez-Soriano, A Muntasell, A Navarro, R Lazarus, F Calafell, J Bertranpetit y F Casals. *Balancing selection is the main force shaping the evolution of innate immunity genes*. J Immunol, vol. 181, no. 2, páginas 1315–1322, 2008.
- [Flores 07] A C Flores, C Y Marcos, N Paladino, M Capucchio, G Theiler, L Arruvito, R Pardo, A Habegger, F Williams, D Middleton y L Fainboim. *KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations*. Tissue Antigens, vol. 69, no. 6, páginas 568–576, 2007.

- [Gardiner 01] C M Gardiner, L A Guethlein, H G Shilling, M Pando, W H Carr, R Rajalingam, C Vilches y P Parham. *Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism*. *J Immunol*, vol. 166, no. 5, páginas 2992–3001, 2001.
- [Garrigan 03] D Garrigan y P W Hedrick. *Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC*. *Evolution*, vol. 57, no. 8, páginas 1707–1722, 2003.
- [Gendzekhadze 06] K Gendzekhadze, P J Norman, L Abi-Rached, Z Layrisse y P Parham. *High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes*. *Immunogenetics*, vol. 58, no. 5-6, páginas 474–480, 2006.
- [Gomez-Lozano 02] N Gomez-Lozano y C Vilches. *Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update*. *Tissue Antigens*, vol. 59, no. 3, páginas 184–193, 2002.
- [Gourraud 10] P A Gourraud, A Meenagh, A Cambon-Thomsen y D Middleton. *Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: implications for KIR data analyses*. *Immunogenetics*, vol. 62, no. 11-12, páginas 729–740, 2010.
- [Grubb 56] R Grubb. *Agglutination of erythrocytes coated with incomplete anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera; the existence of human serum groups*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, vol. 39, no. 3, páginas 195–197, 1956.
- [Guinan 10] K J Guinan, R T Cunningham, A Meenagh, M M Dring, D Middleton y C M Gardiner. *Receptor systems controlling natural killer cell function are genetically stratified in Europe*. *Genes Immun*, vol. 11, no. 1, páginas 67–78, 2010.
- [Gumperz 95] J E Gumperz, V Litwin, J H Phillips, L L Lanier y P Parham. *The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor*. *J Exp Med*, vol. 181, no. 3, páginas 1133–1144, 1995.
- [Hao 05] L Hao y M Nei. *Rapid expansion of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in primates and their coevolution with MHC Class I genes*. *Gene*, vol. 347, no. 2, páginas 149–159, 2005.
- [Hollenbach 10] J A Hollenbach, A Meenagh, C Sleator, C Alaez, M Bengoche, A Canossi, G Contreras, L Creary, I Evseeva, C Gorodezky, R A Hardie, T H Karlson, B Lie, M Luo, M Martinetti, C Navarette, D C de Oliveira, G Ozzella, A Pasi, E Pavlova, S Pinto, L C Porto, P Santos, A Slavcev, D Srinak,

- S Tavoularis, S Tonks, E Trachtenberg, S Vejbaesya y D Middleton. *Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA*. *Tissue Antigens*, vol. 76, no. 1, páginas 9–17, 2010.
- [Horuk 93] R Horuk, C E Chitnis, W C Darbonne, T J Colby, A Rybicki, T J Hadley y L H Miller. *A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor*. *Science*, vol. 261, no. 5125, páginas 1182–1184, 1993.
- [Hou 10] L Hou, M Chen, B Jiang, D Wu, J Ng y C K Hurley. *Thirty allele-level haplotypes centered around KIR2DL5 define the diversity in an African American population*. *Immunogenetics*, vol. 62, no. 8, páginas 491–498, 2010.
- [Hsu 02a] K C Hsu, S Chida, D E Geraghty y B Dupont. *The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism*. *Immunol Rev*, vol. 190, páginas 40–52, 2002.
- [Hsu 02b] K C Hsu, X R Liu, A Selvakumar, E Mickelson, R J O'Reilly y B Dupont. *Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets*. *J Immunol*, vol. 169, no. 9, páginas 5118–5129, 2002.
- [Ingman 00] M Ingman, H Kaessmann, S Paabo y U Gyllensten. *Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans*. *Nature*, vol. 408, no. 6813, páginas 708–713, 2000.
- [Jakobsson 08] M Jakobsson, S W Scholz, P Scheet, J R Gibbs, J M VanLiere, H C Fung, Z A Szpiech, J H Degnan, K Wang, R Guerreiro, J M Bras, J C Schymick, D G Hernandez, B J Traynor, J Simon-Sanchez, M Matarin, A Britton, J van de Leemput, I Rafferty, M Bucan, H M Cann, J A Hardy, N A Rosenberg y A B Singleton. *Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations*. *Nature*, vol. 451, no. 7181, páginas 998–1003, 2008.
- [Jiang 05] K Jiang, F M Zhu, Q F Lv y L X Yan. *Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population*. *Tissue Antigens*, vol. 65, no. 6, páginas 556–563, 2005.
- [Johansson 05] S Johansson, M Johansson, E Rosmaraki, G Vahlne, R Mehr, M Salmon-Divon, F Lemonnier, K Karre y P Hoglund. *Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules*. *J Exp Med*, vol. 201, no. 7, páginas 1145–1155, 2005.

- [Kawashima 09] Y Kawashima, K Pfafferott, J Frater, P Matthews, R Payne, M Addo, H Gatanaga, M Fujiwara, A Hachiya, H Koizumi, N Kuse, S Oka, A Duda, A Prendergast, H Crawford, A Leslie, Z Brumme, C Brumme, T Allen, C Brander, R Kaslow, J Tang, E Hunter, S Allen, J Mulenga, S Branch, T Roach, M John, S Mallal, A Ogwu, R Shapiro, J G Prado, S Fidler, J Weber, O G Pybus, P Klenerman, T Ndung'u, R Phillips, D Heckerman, P R Harrigan, B D Walker, M Takiguchi y P Goulder. *Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I*. Nature, vol. 458, no. 7238, páginas 641–645, 2009.
- [Khakoo 00a] S I Khakoo, R Rajalingam, B P Shum, K Weidenbach, L Flodin, D G Muir, F Canavez, S L Cooper, N M Valiante, L L Lanier y P Parham. *Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans*. Immunity, vol. 12, no. 6, páginas 687–698, 2000.
- [Khakoo 00b] S I Khakoo, R Rajalingam, B P Shum, K Weidenbach, L Flodin, D G Muir, F Canavez, S L Cooper, N M Valiante, L L Lanier y P Parham. *Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans*. Immunity, vol. 12, no. 6, páginas 687–698, 2000.
- [Kulkarni 08] S Kulkarni, R M Single, M P Martin, R Rajalingam, R Badwe, N Joshi y M Carrington. *Comparison of the rapidly evolving KIR locus in Parsis and natives of India*. Immunogenetics, vol. 60, no. 3-4, páginas 121–129, 2008.
- [Lanier 96] L L Lanier y J H Phillips. *Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells*. Immunol Today, vol. 17, no. 2, páginas 86–91, 1996.
- [Lanier 01] L L Lanier. *Face off—the interplay between activating and inhibitory immune receptors*. Curr Opin Immunol, vol. 13, no. 3, páginas 326–331, 2001.
- [Lanier 05] L L Lanier. *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, vol. 23, páginas 225–274, 2005.
- [Lanier 08] L L Lanier. *Evolutionary struggles between NK cells and viruses*. Nat Rev Immunol, vol. 8, no. 4, páginas 259–268, 2008.
- [Legaz 13] Isabel Legaz, María R. López-Álvarez, José A. Campillo, María R. Moya-Quiles, José M. Bolarín, Jesus de la Peña, Gema Salgado, Lourdes Gimeno, Ana M. García-Alonso, Manuel Muro, Manuel Miras, Clara Alonso, María R. Álvarez López y Alfredo Minguela. *KIR gene mismatching and KIR/C ligands in liver transplantation: consequences for short-term liver allograft injury*. Transplantation, vol. 95, no. 8, páginas 1037–1044, April 2013.

- [Legaz 19] Isabel Legaz, Elena Navarro Noguera, Jose Miguel Bolarín, Jose Antonio Campillo, Rosa Moya, Aurelio Luna, Manuel Miras, Alfredo Minguela, Maria Rocio Álvarez López y Manuel Muro. *Patient Sex in the Setting of Liver Transplant in Alcoholic Liver Disease*. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, vol. 17, no. 3, páginas 355–362, June 2019.
- [Legaz 21a] Isabel Legaz, Jose M. Bolarin, Jose A. Campillo, Rosa M. Moya, Aurelio Luna, Eduardo Osuna, Alfredo Minguela, Francisco Sanchez-Bueno, Maria Rocio Alvarez y Manuel Muro. *Pretransplant ascites and encephalopathy and their influence on survival and liver graft rejection in alcoholic cirrhosis disease*. *Archives of medical science: AMS*, vol. 17, no. 3, páginas 682–693, 2021.
- [Legaz 21b] Isabel Legaz, Jose Miguel Bolarín, Elena Navarro, Jose Antonio Campillo, Rosa Moya, María Dolores Pérez-Cárceles, Aurelio Luna, Eduardo Osuna, Manuel Miras, Manuel Muro, Alfredo Minguela y Rocio Alvarez López. *KIR2DL2/S2 and KIR2DS5 in alcoholic cirrhotic patients undergoing liver transplantation*. *Archives of medical science: AMS*, vol. 17, no. 3, páginas 764–774, 2021.
- [Legaz 22] Isabel Legaz, Jose Miguel Bolarín, Jose Antonio Campillo, María R. Moya-Quiles, Manuel Miras, Manuel Muro, Alfredo Minguela y María R. Álvarez López. *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) and Human Leucocyte Antigen C (HLA-C) Increase the Risk of Long-Term Chronic Liver Graft Rejection*. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 20, página 12155, October 2022.
- [Ljunggren 90] H G Ljunggren y K Karre. *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. *Immunol Today*, vol. 11, no. 7, páginas 237–244, 1990.
- [Long 99] E O Long. *Regulation of immune responses through inhibitory receptors*. *Annu Rev Immunol*, vol. 17, páginas 875–904, 1999.
- [López-Álvarez 11] M. R. López-Álvarez, J. A. Campillo, I. Legaz, R. M. Blanco-García, G. Salgado-Cecilia, J. M. Bolarín, L. Gimeno, J. Gil, A. M. García-Alonso, M. Muro, M. R. Alvarez-López, M. Miras y A. Minguela. *Divergences in KIR2D+ natural killer and KIR2D+CD8+ T-cell reconstitution following liver transplantation*. *Human Immunology*, vol. 72, no. 3, páginas 229–237, March 2011.
- [Maenaka 99] K Maenaka, T Juji, D I Stuart y E Y Jones. *Crystal structure of the human p58 killer cell inhibitory receptor (KIR2DL3) specific for HLA-Cw3-related MHC class I*. *Structure*, vol. 7, no. 4, páginas 391–398, 1999.

- [Mandelboim 97] O Mandelboim, S B Wilson, M Vales-Gomez, H T Reyburn y J L Strominger. *Self and viral peptides can initiate lysis by autologous natural killer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 94, no. 9, páginas 4604–4609, 1997.
- [Martin 04] A M Martin, J K Kulski, S Gaudieri, C S Witt, E M Freitas, J Trowsdale y F T Christiansen. *Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B*. Gene, vol. 335, páginas 121–131, 2004.
- [McQueen 02] K L McQueen, B T Wilhelm, K D Harden y D L Mager. *Evolution of NK receptors: a single Ly49 and multiple KIR genes in the cow*. Eur J Immunol, vol. 32, no. 3, páginas 810–817, 2002.
- [Middleton 03] D Middleton, L Menchaca, H Rood y R Komerofsky. *New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>*. Tissue Antigens, vol. 61, no. 5, páginas 403–407, 2003.
- [Middleton 08a] D Middleton, A Meenagh, J Moscoso y A Arnaiz-Villena. *Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents*. Tissue Antigens, vol. 71, no. 2, páginas 105–113, 2008.
- [Middleton 08b] D Middleton, A Meenagh, J I Serrano, J Moscoso y A Arnaiz-Villena. *Different Evolution of Inhibitory and Activating Killer Immunoglobulin Receptors (KIR) in Worldwide Human Populations*. Open Immunology Journal, vol. 1, páginas 42–50, 2008.
- [Middleton 10a] D Middleton y F Gonzelez. *The extensive polymorphism of KIR genes*. Immunology, vol. 129, no. 1, páginas 8–19, 2010.
- [Middleton 10b] D Middleton y F Gonzelez. *The extensive polymorphism of KIR genes*. Immunology, vol. 129, no. 1, páginas 8–19, 2010.
- [Miller 01] J S Miller y V McCullar. *Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2*. Blood, vol. 98, no. 3, páginas 705–713, 2001.
- [Mingari 96] M C Mingari, F Schiavetti, M Ponte, C Vitale, E Maggi, S Romagnani, J Demarest, G Pantaleo, A S Fauci y L Moretta. *Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, no. 22, páginas 12433–12438, 1996.
- [Mingari 98] M C Mingari, M Ponte, S Bertone, F Schiavetti, C Vitale, R Bellomo, A Moretta y L Moretta. *HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, no. 3, páginas 1172–1177, 1998.

- [Moffett-King 02] A Moffett-King. *Natural killer cells and pregnancy*. Nat Rev Immunol, vol. 2, no. 9, páginas 656–663, 2002.
- [Morales 23] Raquel Morales, José Miguel Bolarín, Manuel Muro y Isabel Legaz. *Presence of KIR2DL2/S2, KIR2DL5, and KIR3DL1 molecules in liver transplant recipients with alcoholic cirrhosis could be implicated in death by graft failure*. Diagnostics, vol. En prensa, March 2023.
- [Moretta 93] A Moretta, M Vitale, C Bottino, A M Orengo, L Morelli, R Augugliaro, M Barbaresi, E Ciccone y L Moretta. *P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities*. J Exp Med, vol. 178, no. 2, páginas 597–604, 1993.
- [Mourant 76] A E Mourant, Ada C Kopec y Kazimiera Domaniewska-Sobczak. *The distribution of the human blood groups, and other polymorphisms*. Oxford University Press, London, 2d edition, 1976.
- [Norman 01] P J Norman, H A Stephens, D H Verity, D Chandanayingyong y R W Vaughan. *Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups*. Immunogenetics, vol. 52, no. 3-4, páginas 195–205, 2001.
- [Norman 07] P J Norman, L Abi-Rached, K Gendzekhadze, D Korbel, M Gleimer, D Rowley, D Bruno, C V Carrington, D Chandanayingyong, Y H Chang, C Crespi, G Saruhan-Direskeneli, P A Fraser, K Hameed, G Kamkamidze, K A Koram, Z Layrisse, N Matamoros, J Mila, M H Park, R M Pitchappan, D D Ramdath, M Y Shiau, H A Stephens, S Struik, D H Verity, R W Vaughan, D Tyan, R W Davis, E M Riley, M Ronaghi y P Parham. *Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans*. Nat Genet, vol. 39, no. 9, páginas 1092–1099, 2007.
- [Ordonez 08] D Ordonez, A Meenagh, N Gomez-Lozano, J Castano, D Middleton y C Vilches. *Duplication, mutation and recombination of the human orphan gene KIR2DS3 contribute to the diversity of KIR haplotypes*. Genes Immun, vol. 9, no. 5, páginas 431–437, 2008.
- [Owen 00] R Owen. *Karl Landsteiner and the first human marker locus*. Genetics, vol. 155, no. 3, páginas 995–998, 2000.
- [Parham 08] P Parham. *The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity*. Semin Immunol, vol. 20, no. 6, páginas 311–316, 2008.
- [Pende 96] D Pende, R Biassoni, C Cantoni, S Verdiani, M Falco, C di Donato, L Accame, C Bottino, A Moretta y L Moretta. *The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of*

- inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer.* J Exp Med, vol. 184, no. 2, páginas 505–518, 1996.
- [Rajagopalan 99] S Rajagopalan y E O Long. *A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells.* J Exp Med, vol. 189, no. 7, páginas 1093–1100, 1999.
- [Rajalingam 01] R Rajalingam, C M Gardiner, F Canavez, C Vilches y P Parham. *Identification of seventeen novel KIR variants: fourteen of them from two non-Caucasian donors.* Tissue Antigens, vol. 57, no. 1, páginas 22–31, 2001.
- [Rajalingam 02] R Rajalingam, P Krausa, H G Shilling, J B Stein, A Balamurugan, M D McGinnis, N W Cheng, N K Mehra y P Parham. *Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus.* Immunogenetics, vol. 53, no. 12, páginas 1009–1019, 2002.
- [Rajalingam 08] R Rajalingam, Z Du, A Meenagh, L Luo, V J Kavitha, R Pavithra-Arulvani, A Vidhyalakshmi, S K Sharma, I Balazs, E F Reed, R M Pitchappan y D Middleton. *Distinct diversity of KIR genes in three southern Indian populations: comparison with world populations revealed a link between KIR gene content and pre-historic human migrations.* Immunogenetics, vol. 60, no. 5, páginas 207–217, 2008.
- [Robinson 13] James Robinson, Jason A. Halliwell, Hamish McWilliam, Rodrigo Lopez y Steven G. E. Marsh. *IPD—the Immuno Polymorphism Database.* Nucleic Acids Research, vol. 41, no. D1, páginas D1234–D1240, January 2013.
- [Rosenberg 02] N A Rosenberg, J K Pritchard, J L Weber, H M Cann, K K Kidd, L A Zhivotovsky y M W Feldman. *Genetic structure of human populations.* Science, vol. 298, no. 5602, páginas 2381–2385, 2002.
- [Sanchez-Mazas 11a] A Sanchez-Mazas, M Fernandez-Vina, D Middleton, J A Hollenbach, S Buhler, D Di, R Rajalingam, J M Dugoujon, S J Mack y E Thorsby. *Immunogenetics as a tool in anthropological studies.* Immunology, vol. 133, no. 2, páginas 143–164, 2011.
- [Sanchez-Mazas 11b] A Sanchez-Mazas, M Fernandez-Vina, D Middleton, J A Hollenbach, S Buhler, D Di, R Rajalingam, J M Dugoujon, S J Mack y E Thorsby. *Immunogenetics as a tool in anthropological studies.* Immunology, vol. 133, no. 2, páginas 143–164, 2011.
- [Selvakumar 97] A Selvakumar, U Steffens y B Dupont. *Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors.* Immunol Rev, vol. 155, páginas 183–196, 1997.
- [Shilling 98] H G Shilling, K Lienert-Weidenbach, N M Valiante, M Uhrberg y P Parham. *Evidence for recombination as a mechanism for KIR diversification.* Immunogenetics, vol. 48, no. 6, páginas 413–416, 1998.

- [Shilling 02a] H G Shilling, L A Guethlein, N W Cheng, C M Gardiner, R Rodriguez, D Tyan y P Parham. *Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype*. *J Immunol*, vol. 168, no. 5, páginas 2307–2315, 2002.
- [Shilling 02b] H G Shilling, N Young, L A Guethlein, N W Cheng, C M Gardiner, D Tyan y P Parham. *Genetic control of human NK cell repertoire*. *J Immunol*, vol. 169, no. 1, páginas 239–247, 2002.
- [Single 07] R M Single, M P Martin, X Gao, D Meyer, M Yeager, J R Kidd, K K Kidd y M Carrington. *Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA*. *Nat Genet*, vol. 39, no. 9, páginas 1114–1119, 2007.
- [Single 08] R M Single, M P Martin, D Meyer, X Gao y M Carrington. *Methods for assessing gene content diversity of KIR with examples from a global set of populations*. *Immunogenetics*, vol. 60, no. 12, páginas 711–725, 2008.
- [Snyder 99] G A Snyder, A G Brooks y P D Sun. *Crystal structure of the HLA-Cw3 allotype-specific killer cell inhibitory receptor KIR2DL2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 7, páginas 3864–3869, 1999.
- [Steffens 98] U Steffens, Y Vyas, B Dupont y A Selvakumar. *Nucleotide and amino acid sequence alignment for human killer cell inhibitory receptors (KIR)*, 1998. *Tissue Antigens*, vol. 51, no. 4 Pt 1, páginas 398–413, 1998.
- [Steinberg 81] Arthur Gerald Steinberg y Charles E Cook. *The distribution of the human immunoglobulin allotypes*. Oxford Univ Pr, 1981.
- [Thananchai 07] H Thananchai, G Gillespie, M P Martin, A Bashirova, N Yawata, M Yawata, P Easterbrook, D W McVicar, K Maenaka, P Parham, M Carrington, T Dong y S Rowland-Jones. *Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B*. *J Immunol*, vol. 178, no. 1, páginas 33–37, 2007.
- [Toneva 01a] M Toneva, V Lepage, G Lafay, N Dulphy, M Busson, S Lester, A Vu-Trien, A Michaylova, E Naumova, J McCluskey y D Charron. *Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations*. *Tissue Antigens*, vol. 57, no. 4, páginas 358–362, 2001.
- [Toneva 01b] M Toneva, V Lepage, G Lafay, N Dulphy, M Busson, S Lester, A Vu-Trien, A Michaylova, E Naumova, J McCluskey y D Charron. *Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations*. *Tissue Antigens*, vol. 57, no. 4, páginas 358–362, 2001.
- [Traherne 10] J A Traherne, M Martin, R Ward, M Ohashi, F Pellett, D Gladman, D Middleton, M Carrington y J Trowsdale. *Mechanisms of copy number variation and hybrid gene formation in the KIR immune gene complex*. *Hum Mol Genet*, vol. 19, no. 5, páginas 737–751, 2010.

- [Uhrberg 97] M Uhrberg, N M Valiante, B P Shum, H G Shilling, K Lienert-Weidenbach, B Corliss, D Tyan, L L Lanier y P Parham. *Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes*. *Immunity*, vol. 7, no. 6, páginas 753–763, 1997.
- [Uhrberg 02] M Uhrberg, P Parham y P Wernet. *Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes*. *Immunogenetics*, vol. 54, no. 4, páginas 221–229, 2002.
- [Uhrberg 05] M Uhrberg. *The KIR gene family: life in the fast lane of evolution*. *Eur J Immunol*, vol. 35, no. 1, páginas 10–15, 2005.
- [Vales-Gomez 98] M Vales-Gomez, H T Reyburn, R A Erskine y J Strominger. *Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 24, páginas 14326–14331, 1998.
- [Vales-Gomez 99] M Vales-Gomez, H T Reyburn, R A Erskine, M Lopez-Botet y J L Strominger. *Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E*. *EMBO J*, vol. 18, no. 15, páginas 4250–4260, 1999.
- [Valiante 97a] N M Valiante, K Lienert, H G Shilling, B J Smits y P Parham. *Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution*. *Immunol Rev*, vol. 155, páginas 155–164, 1997.
- [Valiante 97b] N M Valiante, M Uhrberg, H G Shilling, K Lienert-Weidenbach, K L Arnett, A D'Andrea, J H Phillips, L L Lanier y P Parham. *Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors*. *Immunity*, vol. 7, no. 6, páginas 739–751, 1997.
- [Vely 01] F Vely, M Peyrat, C Couedel, J Morcet, F Halary, F Davodeau, F Romagne, E Scotet, X Saulquin, E Houssaint, N Schleinitz, A Moretta, E Vivier y M Bonneville. *Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements*. *J Immunol*, vol. 166, no. 4, páginas 2487–2494, 2001.
- [Vilches 02] C Vilches y P Parham. *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. *Annu Rev Immunol*, vol. 20, páginas 217–251, 2002.
- [Vivier 97] E Vivier y M Daeron. *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*. *Immunol Today*, vol. 18, no. 6, páginas 286–291, 1997.
- [Wagtmann 95] N Wagtmann, R Biassoni, C Cantoni, S Verdiani, M S Malnati, M Vitale, C Bottino, L Moretta, A Moretta y E O Long. *Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains*. *Immunity*, vol. 2, no. 5, páginas 439–449, 1995.

- [Wende 99] H Wende, M Colonna, A Ziegler y A Volz. *Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4*. Mamm Genome, vol. 10, no. 2, páginas 154–160, 1999.
- [Whang 05] D H Whang, H Park, J A Yoon y M H Park. *Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families*. Hum Immunol, vol. 66, no. 2, páginas 146–154, 2005.
- [Williams 03] F Williams, L D Maxwell, I A Halfpenny, A Meenagh, C Sleator, M D Curran y D Middleton. *Multiple copies of KIR 3DL/S1 and KIR 2DL4 genes identified in a number of individuals*. Hum Immunol, vol. 64, no. 7, páginas 729–732, 2003.
- [Wilson 00a] M J Wilson, M Torkar, A Haude, S Milne, T Jones, D Sheer, S Beck y J Trowsdale. *Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 9, páginas 4778–4783, 2000.
- [Wilson 00b] M J Wilson, M Torkar, A Haude, S Milne, T Jones, D Sheer, S Beck y J Trowsdale. *Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 9, páginas 4778–4783, 2000.
- [Witt 99a] C S Witt, C Dewing, D C Sayer, M Uhrberg, P Parham y F T Christiansen. *Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination*. Transplantation, vol. 68, no. 11, páginas 1784–1789, 1999.
- [Witt 99b] C S Witt, C Dewing, D C Sayer, M Uhrberg, P Parham y F T Christiansen. *Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination*. Transplantation, vol. 68, no. 11, páginas 1784–1789, 1999.
- [Yawata 02a] M Yawata, N Yawata, L Abi-Rached y P Parham. *Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family*. Crit Rev Immunol, vol. 22, no. 5-6, páginas 463–482, 2002.
- [Yawata 02b] M Yawata, N Yawata, K L McQueen, N W Cheng, L A Guethlein, R Rajalingam, H G Shilling y P Parham. *Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression*. Immunogenetics, vol. 54, no. 8, páginas 543–550, 2002.
- [Yawata 06] M Yawata, N Yawata, M Draghi, A M Little, F Partheniou y P Parham. *Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function*. J Exp Med, vol. 203, no. 3, páginas 633–645, 2006.

- [Young 02] N T Young y M Uhrberg. *KIR expression shapes cytotoxic repertoires: a developmental program of survival*. Trends Immunol, vol. 23, no. 2, páginas 71–75, 2002.
- [Zhu 10] B F Zhu, H D Wang, C M Shen, Y J Deng, G Yang, Q J Wu, P Xu, H X Qin, S L Fan, P Huang, L B Deng, R Lucas y Z Y Wang. *Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in the Tibetan ethnic minority group of China*. Hum Immunol, vol. 71, no. 11, páginas 1116–1123, 2010.