



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FES ZARAGOZA

**Amplificación de los Exones 2, 3 y 4 del Gene MICA en una
Población Mestiza Mexicana.**

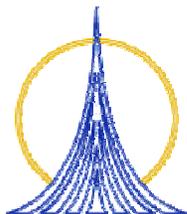
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Nombre: Raúl Ocotitla Jiménez

Director: Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón

Asesor: QFB Araceli García Del Valle

Área del proyecto: Inmunogenética



México D.F., 30 de Mayo del 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN
DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER (UIDCyC); LABORATORIO DE
ONCOLOGÍA, FES ZARAGOZA UNAM

PROYECTO PAPIIT IN216102

ÍNDICE

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
3	MARCO TEÓRICO	4
3.1	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	4
3.1.1	Descubrimiento	4
3.1.2	Estudios en humanos	5
3.1.3	Organización y distribución genómica del CMH	6
3.1.4	Enfermedades asociadas con los HLA	8
3.2	Descubrimiento y características estructurales de los genes MIC	9
3.3	Expresión de las moléculas MIC	11
3.4	Polimorfismo del gene MICA	12
3.5	Polimorfismo del gene MICB	16
3.6	Polimorfismo del gene MICA y su asociación en padecimientos	17
3.7	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5	OBJETIVOS	25
6	HIPÓTESIS	26
7	DISEÑO EXPERIMENTAL	27
8	DIAGRAMA DE FLUJO	30
9	METODOLOGÍA	32
9.1	Técnica para la extracción de ADN	32
9.2	Técnica para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
9.3	Técnica para electroforesis en gel de agarosa	36
10	RESULTADOS	38
10.1	Análisis estadístico del lugar de origen	38
10.2	Análisis estadístico de padecimientos	42
10.3	Estandarización del PCR	44
10.4	Electroforesis	45

	10.5	Bandas obtenidas de los amplificadores	45
	10.6	Análisis densitométrico	49
11	ANÁLISIS DE RESULTADOS		52
12	CONCLUSIONES		59
13	SUGERENCIAS		60
14	ANEXOS		61
15	GLOSARIO		64
16	REFERENCIAS		66

1. RESUMEN

El complejo mayor de histocompatibilidad contiene como bien se sabe a los genes HLA de clase I y junto con éstos en el mismo cromosoma seis se encuentra la familia MIC (MHC class I Chain related genes). El gene MICA pertenece a esta familia, se ha visto es muy polimórfico y, en diversos estudios se ha analizado su polimorfismo a nivel poblacional y asociación con padecimientos infecciosos, autoinmunes e inflamatorios. Sin embargo, no hay estudios realizados en poblaciones con características étnicas únicas como es la mexicana. En consecuencia, en este trabajo se amplificaron los exones 2, 3 y 4 del gene MICA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando ADN extraído de 103 personas mestizas mexicanas sanas. Los resultados obtenidos muestran que para el exón 2 se amplificó el 95.14% de muestras, para el exón 3 el 68.93% y para el exón 4 el 75.7% respectivamente. Consideramos que la diferencia en los porcentajes de los exones amplificados puede deberse a diversos factores pero ello no afectará la caracterización molecular del gene MICA, ya que con las muestras amplificadas se puede realizar el análisis a nivel molecular en la población mexicana. Por lo tanto, este trabajo abre las puertas para la realización de estudios donde se investigue el polimorfismo del gene MICA y su asociación con padecimientos propios de la población mexicana.

2. INTRODUCCIÓN

Las moléculas del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) pertenecen a una familia de inmunoglobulinas que al parecer han evolucionado del mismo gene primordial como inmunoglobulinas y como moléculas receptoras de las células T. El CMH contiene a los genes de los antígenos leucocitarios humanos de clase I (HLA, del inglés, human leukocyte antigens), dentro de estos genes se encuentran los HLA-A, HLA-B y HLA-C. Se sabe que un gran número de enfermedades están asociadas con alelos particulares del HLA-B y C, por ejemplo: la enfermedad de Behcet, psoriasis vulgaris, salmonella artritis, yersinia artritis y algunas enfermedades infecciosas (Collins 2004, Stites, 2002).

La molécula MICA esta relacionada con el HLA-B debido a que es codificada por un gene largo de 11722 pares de bases (pb), localizado aproximadamente a 46 kilobases (kb) del centrómero en dirección del locus HLA-B. MICA pertenece a la familia MIC que se compone de dos genes (MICA y MICB) además de cinco pseudogenes adicionales (MICC a MICG). MICA es altamente polimórfico con 55 alelos distintos y MICB de un poco más de 17 alelos, el significado funcional del polimorfismo que presenta MICA y MICB aún no es establecido. MICA y MICB, son similares estructuralmente a los HLA de clase I y son expresados en líneas celulares de epitelio y células intestinales. Su expresión es independiente del enlace a péptidos, ambas moléculas funcionan como ligandos para células NK, células $\gamma\delta$ T y células CD8⁺ $\alpha\beta$ T. La estrecha relación que presenta MICA y el HLA-B ha convertido a los alelos de MICA en potenciales candidatos susceptibles de las clásicas enfermedades asociadas con CMH clase I. Asimismo, el significado del polimorfismo de MICB y su asociación con ciertos padecimientos lo hacen un buen candidato para investigaciones futuras (Bahram *et al.* 1996b, Leelayuwat *et al.* 1995, Mendoza *et al.* 2002).

En la actualidad se encuentran publicados diversos estudios en distintas poblaciones sobre el polimorfismo que presentan los genes MICA y MICB, además

de su posible relación de éstos en diversos padecimientos autoinmunes, pero hasta el momento no se ha realizado ninguna investigación en población mestiza mexicana que identifique los distintos alelos que presentan los genes de MICA y MICB, así como tampoco se han realizado estudios para investigar la relación que pudiera existir entre MICA y MICB con distintos padecimientos que se han informado en otras poblaciones. La amplificación de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA, que son los más polimórficos, representan una primera aproximación para el estudio del polimorfismo en la población mestiza mexicana.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

3.1.1 DESCUBRIMIENTO

El descubrimiento inicial del complejo mayor de histocompatibilidad de ratón se debe a George Snell y colaboradores, utilizando técnicas genéticas clásicas para el estudio del rechazo de tumores y otros tejidos trasplantados. En una población de animales, algunos genes están representados por una única secuencia normal de aminoácidos; cualquier variante de esta secuencia representa una mutación poco frecuente y puede dar lugar a una enfermedad. En otro tipo de genes, la secuencia de ácidos nucleicos puede variar con una frecuencia relativamente alta entre los individuos normales de la población; es decir que al menos el 1% de los individuos puede expresar un gene que difiera del gene homólogo del resto de los miembros de la población (Margni, 1996).

Cuando se injerta un tejido u órgano, como una tira de piel, de un animal a otro, pueden ocurrir dos cosas. En unos casos, la piel injertada sobrevive y funciona normalmente; en otros, el sistema inmune destruye el injerto. Mediante la determinación de que si los injertos intercambiados entre diferentes cepas de ratones endogámicas eran o no rechazados, se hicieron observaciones clave acerca de las bases genéticas del rechazo de los mismos. Con los diferentes resultados de los injertos entre animales singénicos y alogénicos se estableció una base genética para el reconocimiento de éste como tejido extraño. Los genes responsables de la aceptación o rechazo de un tejido injertado considerado como similar a los tejidos propios o como extraño son los genes de histocompatibilidad, y las diferencias entre lo extraño y lo propio se atribuyeron al polimorfismo genético entre los diferentes alelos de histocompatibilidad (Margni, 1996, Abbas, 2002).

3.1.2 ESTUDIOS EN HUMANOS

El desarrollo de transfusiones alogénicas de sangre y especialmente de trasplantes alogénicos de órganos como métodos de tratamientos en medicina clínica, proporcionaron un fuerte impulso para la detección y definición de los genes que controlan las reacciones de rechazo en el hombre. Jean Dausset y otros observaron que los pacientes que rechazaban riñones o sufrían reacciones transfusionales frente a leucocitos, desarrollaban anticuerpos circulantes contra antígenos de los leucocitos de la sangre o del órgano del donante. En presencia del complemento, el suero del receptor lisa los linfocitos del donante y linfocitos obtenidos del órgano del donante. Estos sueros que reaccionan contra las células de individuos alogénicos se llaman aloantisueros, cuyos blancos moleculares se denominan aloantígenos (Abbas, 2002).

Los aloantígenos reconocidos por estos sueros se llamaron antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés, human leukocyte antigens) debido a que se expresan en la superficie de los leucocitos. Los tres primeros genes que se definieron con técnicas serológicas se bautizaron como HLA-A, HLA-B y HLA-C, los cuales corresponden a los HLA clase I del CMH. Los siguientes tres se detectaron en una región adyacente, llamada HLA-D. El primer producto génico detectado por aloanticuerpos que correspondía al HLA-D se llamo relacionado con el HLA-D o HLA-DR. Los últimos dos genes recibieron el nombre de HLA-DQ y HLA-DP, eligiendo las letras P y Q por su proximidad a la R en el alfabeto, y pertenecen a los HLA clase II del CMH (Margni, 1996, Abbas, 2002).

A la fecha se han identificado más de 500 alelos distintos para algunos de los locus del HLA. Los genes del CMH son los genes más polimórficos que se encuentran en el genoma de todas las especies analizadas. El uso de anticuerpos para el estudio de las diferencias aloantigénicas entre donantes y receptores en trasplantes humanos se completo con la reacción leucocitaria mixta (MLR, del inglés, mixed leukocyte reaction), una prueba para el reconocimiento de moléculas

del CMH extrañas por las células T. El estudio de las MLR alogénicas llevó a la conclusión de que hay dos clases de linfocitos T que reconocen y responden a diferentes clases de productos del CMH. Las células CD4⁺, la mayoría de las cuales son células colaboradoras productoras de citocinas, son específicas para las moléculas clase II del MHC. Las células T CD8⁺, la mayoría de las cuales son linfocitos T citolíticos (CTL) o sus precursores, son específicos para las moléculas de clase I del CMH, es decir, las células T CD4⁺ reconocen antígenos extraños unidos a las moléculas de clase II, y las células T CD8⁺ reconocen antígenos extraños unidos a moléculas de clase I (Margni, 1996, Abbas, 2002, Gaudieri *et al.* 1999).

3.1.3 ORGANIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN GENÓMICA DEL CMH

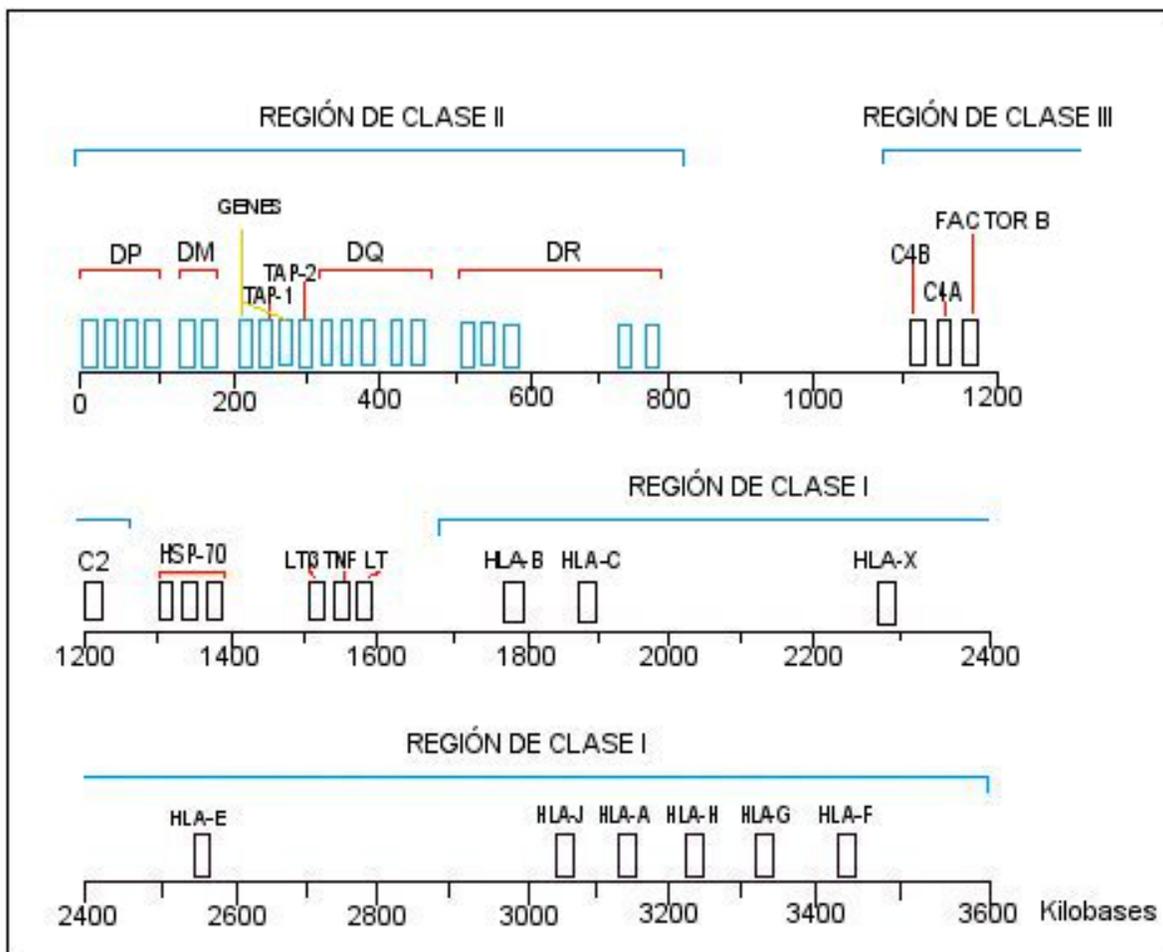
En el ser humano el complejo mayor de histocompatibilidad se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, ocupa un gran segmento de ADN que se extiende alrededor de 3500 kilobases (kb). Muchos de los genes encontrados en el CMH codifican proteínas cuya función aún se desconoce, además de que hay muchos genes aún sin identificar, principalmente en la región de clase I (Abbas, 2002).

Se ha descubierto que la región de clase II del CMH contiene genes cuya expresión es necesaria para la biosíntesis de las moléculas de clase I y II. Dos de estos genes, llamados transportadores en el procesamiento del antígeno 1 y 2 (TAP, del inglés, transporter in antigen processing), codifican las subunidades de una proteína heterodimérica que transporta péptidos del citosol al retículo endoplásmico, donde pueden asociarse con cadenas pesadas de clase I recién traducidas. El complemento, también conocido como región de clase III, es telomérico a la región de clase II y codifica componentes del sistema del complemento (C2, C4A, C4B y Factor B), así como la enzima esteroidea 21-hidroxilasa. La porción más telomérica del CMH contiene los genes de la cadena α de clase I en la secuencia HLA-B, C y A. Los genes para citocinas, como el

factor de necrosis tumoral (TNF) y linfotoxina (LT), así como para la linfotoxina β ($LT\beta$), estructuralmente relacionada, se localizan entre las regiones del complemento y la de clase I (ver figura 1). Algunas proteínas de choque térmico también se localizan en esta región (Abbas, 2002).

Los modelos generales de organización de intron-exón de los genes de clase I y II es similar a la de otros genes. En todos los genes del CMH, el primer exón codifica las secuencias líder o señal que dirigen las proteínas recién sintetizadas al retículo endoplásmico. Cada uno de los segmentos extracelulares de unos 90 aminoácidos esta codificado por un gran exón separado. Las regiones transmembrana y citoplasmática son codificadas por varios exones pequeños.

Figura 1: Mapa molecular del complejo mayor de histocompatibilidad



La expresión de las moléculas del CMH en diferentes tipos celulares determina que los linfocitos T puedan o no interactuar con antígenos extraños presentes dentro de estas células. Los linfocitos T citolíticos CD8⁺ reconocen antígenos extraños tales como péptidos virales cuando se unen a moléculas de clase I del CMH. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen antígenos unidos a las moléculas de clase II del CMH. La expresión de las moléculas de clase I y II del CMH está regulada por la diferenciación específica de tejidos y células, y por estímulos inflamatorios extrínsecos (Abbas, 2002, Gruem y Weissman 1997).

3.1.4 ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LOS HLA

Como es bien conocido algunos padecimientos autoinmunes son asociados con alelos específicos del HLA por lo que se han realizado estudios en los cuales se estudia la relación de dichos alelos con enfermedades tales como artritis juvenil, donde se han descubierto pacientes que poseen ciertos tipos tisulares de HLA con frecuencias mayores a las esperadas. De esta forma, las personas con la enfermedad pauciarticular de inicio temprano, tienden a ser positivas para los antígenos HLA-DR5, o HLA-DR8, mientras que aquellos con la enfermedad pauciarticular de inicio tardío, tienden a ser HLA-B27 positivos. Los pacientes con enfermedad poliarticular positiva a factor reumatoide, tienden a ser HLA-D4 positivos, y aquellos con la enfermedad sistémica, tienden a ser HLA-DR5 positivos (Stites, 2002).

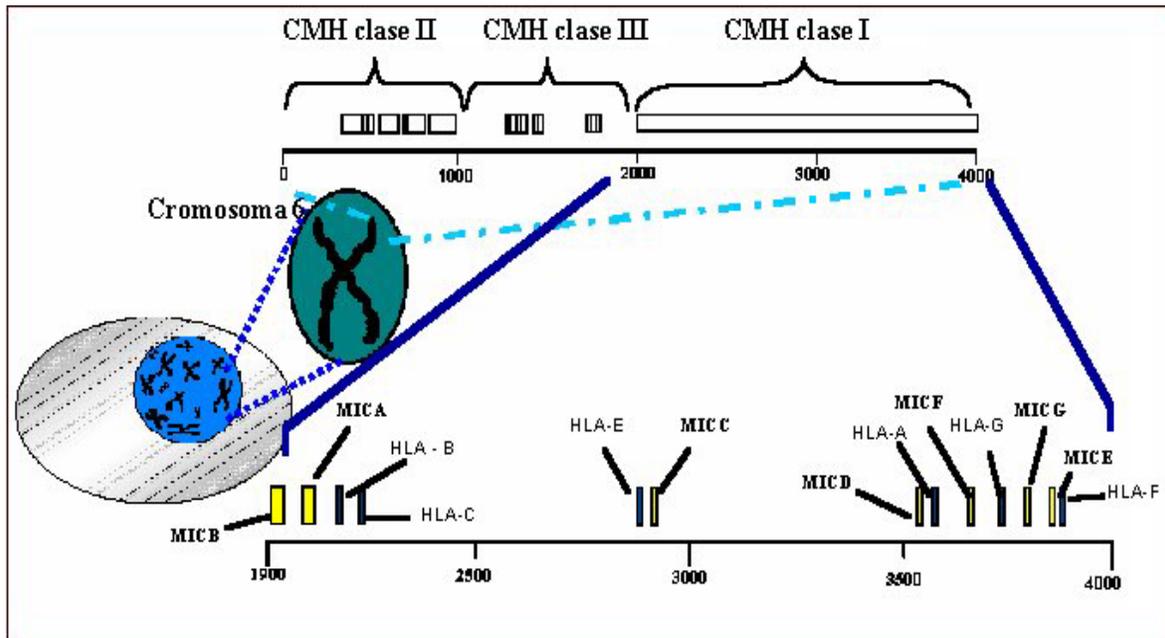
En el caso de pacientes que padecen de diabetes mellitus tipo I, está bien documentado que más del 90 % de los pacientes tienen HLA-DR3, -DR4 o ambos, y existe una relación negativa con HLA-DR2. Se presenta un riesgo adicional cuando están presentes HLA-DR3 y -DR4. Sin embargo, pocos individuos que tienen HLA-DR3 y -DR4 desarrollan este tipo de diabetes. Una anomalía genética estrechamente unida a estos haplotipos de HLA puede explicar esta paradoja. El análisis de restricción de los genes de la cadena β de HLA-DQ, indica un

nucleótido único en posición 56, en personas susceptibles a diabetes tipo I quienes tienen también el haplotipo HLA-DR3/4. Este gene de la región de DQ quizá sea el verdadero gene de susceptibilidad a la enfermedad. Por otro lado los sujetos con psoriasis y artritis periférica tienen incremento en la prevalencia de haplotipos de HLA-DR4, A26 y Bw38. El 45 % de los individuos con espondilitis tienen HLA-B27. Otros antígenos HLA pueden relacionarse con artritis psoriásica periférica. En lo que se refiere a la enfermedad de Behcet algunos estudios muestran incremento en la prevalencia de HLA-B5 y HLA-B51 (Stites, 2002, Claus *et al.* 2000, Dawkins 2000, Vargas *et al.* 1999, Vargas *et al.* 2002).

3.2 DESCUBRIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS GENES MIC

El complejo mayor de histocompatibilidad humano contiene a los genes de clase I y con éstos a los genes MIC que se encuentran relacionados con los HLA de clase I, están localizados junto con el CMH en el cromosoma 6 (ver figura 2). En estudios de mapeo genético se han identificado siete locus de MIC (MICA-MICG) de los que solo MICA y MICB codifican para transcritos de mRNA, es decir, codifican para síntesis de proteína, los demás son pseudogenes debidos a mutaciones puntuales. El descubrimiento de esta familia de genes se debe a dos grupos de trabajo distintos, uno encabezado por Bahram en 1994 en donde se les da el nombre de genes MIC, por otro lado el grupo de investigadores encabezado por Leelayuwat, ellos les dieron el nombre de PERB pero el nombre con el que se les conoce comúnmente es de genes MIC (Bahram *et al.* 1996b, Collins 2004, Leelayuwat *et al.* 1995).

Figura 2: Localización genómica de los genes MIC con respecto a los genes del CMH clase I

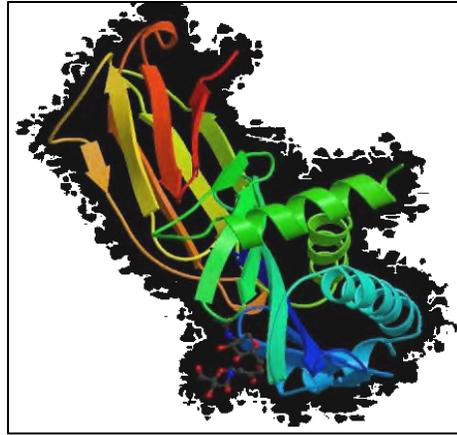


MICA y MICB están localizados a 46.4 y 141.2 kilobases (kb) respectivamente del centrómero en dirección al locus del HLA-B, por lo que se encuentran muy relacionados MICA y MICB con el HLA-B. El gene MICA codifica para transcritos de 1382 pares de bases (pb) y MICB codifica para transcritos de 2376 pares de bases. La molécula MICA es codificada por un inusual y largo gene de 11722 pares de bases, para MICB se reporta una secuencia de nucleótidos de 12930 pares de bases. La organización genómica de MICB es muy similar a la de MICA pero tiene otras características que los diferencian de los genes de clase I. A diferencia de los genes de clase I presentan un extenso intrón de 6840 pb para el gene MICA y de 7352 para MICB el cual separa los dos primeros exones (Bahram *et al.* 1996a, Bahram *et al.* 1996b).

También cuentan con un sexto exón de 302 pb para MICA y de 1338 para el gene MICB, el cual codifica para la parte citoplasmática y para la secuencia 3' no traducida (3' UT). Este exceso de 3' UT es el responsable de la diferencia de los

transcritos de MICA y MICB que es de aproximadamente de 1 kb (Bahram *et al.* 1996b, Mendoza *et al.* 2002, Leelayuwat *et al.* 1994, Li *et al.* 1999).

Figura 3: Estructura tridimensional de la molécula MICA



3.3 EXPRESIÓN DE LAS MOLECULAS MIC

MICA y MICB muestran una similitud del 19%, 25% y 35% en lo que se refiere a los dominios alfa 1, alfa 2 y alfa 3 a otros genes del CMH clase I. Se ha observado que a diferencia de las moléculas del HLA las moléculas de MICA y MICB no están asociadas a β_2 -microglobulina y probablemente no presentan péptidos en su superficie. Pero en diversos estudios se ha sugerido la posibilidad de que MICA y posiblemente MICB estén envueltas en la vigilancia inmunológica del intestino (Mendoza *et al.* 1998).

MICA fue aislado a partir de fibroblastos y células epiteliales (keratina) humanas, mismos donde son detectados específicamente. Tanto MICA como MICB son expresados en líneas celulares epiteliales y células intestinales. Su expresión es independiente del enlace a péptidos y ambas moléculas funcionan como ligandos para las células NK, $\gamma\delta$ T y células $CD8^+$ $\alpha\beta$ T. También MICA y MICB son frecuentemente expresados en tumores epiteliales (Claus *et al.* 2000, Collins 2004, Kayano *et al.* 2002, Steinle *et al.* 1998, Zwirner *et al.* 1998).

Se ha visto que el polimorfismo de estos genes es grande, aunque en un principio eran pocos los alelos que se conocían, en la actualidad se han descrito 55 variantes alélicas para MICA y 17 variantes para MICB. Las variantes alélicas en MICA son en los exones 2, 3 y 4, los cuales se ha visto son los más polimórficos (Fischer *et al.* 2000, Fodil *et al.* 1996).

El significado funcional del polimorfismo que presentan no es del todo claro, dada la proximidad y la fuerte asociación entre MICA y HLA-B, los alelos de MICA son potenciales candidatos a tener relación con las enfermedades clásicas del HLA (Bolognesi *et al.* 2001, González *et al.* 2002, Visser *et al.* 1998).

La región entre el HLA-B y BAT1 está implicada en el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes, entre ellas la enfermedad de Behcet, diabetes mellitus insulina-dependiente, y miastenia gravis. Debido a que péptidos enlazados a MICA pueden ser reconocidas por células $\gamma\delta$ T, pueden potencialmente estar envueltos en enfermedades autoinmunes. Esto es realmente importante en la investigación de la posible correlación entre el polimorfismo genético de MICA y el desarrollo de estas enfermedades (Mizuki *et al.* 1997, Picco *et al.* 2002, Zou y Stastny 2002).

3.4 POLIMORFISMO DEL GENE MICA

Se han realizado varios estudios para determinar los distintos alelos que presenta el gene MICA y saber el significado del polimorfismo de esta familia de genes (Gaudieri *et al.* 1997). Tal es el caso de Mendoza y colaboradores que han estudiado el polimorfismo del gene MICA empleando la prueba de secuenciación-específica de oligonucleotidos (SSOP, por sus siglas en inglés, sequence-specific oligonucleotide probe). El trabajo que realizaron fue hecho con 30 oligonucleotidos analizando el polimorfismo de los exones 2, 3 y 4 que han demostrado ser los más

polimórficos del gene, ellos utilizaron 103 líneas celulares B-linfoblásticas, las cuales tenían bien caracterizado su HLA.

En este estudio cada exón fue amplificado individualmente mediante PCR usando un locus específico de primers, bloqueado en membranas de nylon e hibridizado con la SSOPs.

Encontraron que de las 103 muestras de ADN analizadas, 85 eran parecidas a los 16 alelos conocidos hasta el momento. Doce líneas celulares no dieron parentesco con ninguno de los alelos descritos de MICA, por lo cual no se logró establecer a que alelo pertenecían. Otro dato interesante del estudio fue que de las 103 líneas celulares 6 tuvieron combinaciones ambiguas de alelos de MICA, y 12 que no participaron en la hibridización y son potenciales candidatos a ser nuevos alelos de MICA (Mendoza *et al.* 1998).

Por otra parte, un estudio realizado por Mizuki y colaboradores demostró que durante el análisis de secuenciación de nucleótidos del gene MICA se observó la presencia del polimorfismo de un microsatélite triple repetido de GCT/AGC, en la región de la transmembrana del gene MICA. Esto se observó en 68 líneas celulares B con HLA homocigótico, 5 distintas secuencias de alelos de este microsatélite fueron detectados (A4, A5, A5.1, A6 y A9). Cuatro de estos consisten de 4, 5, 6 y 9 repeticiones de GCT/AGC. Sin embargo un alelo contiene cinco tripletes repetidos más la inserción de un nucleótido adicional (GGCT/AGCC), causando mutaciones que dan como resultado la terminación prematura del codón (TAA) en la región de la transmembrana, este alelo puede codificar una molécula soluble de MICA.

Debido a que MICA es específicamente expresado en fibroblastos y células epiteliales, puede jugar un papel importante en la respuesta inmune. Dadas las observaciones anteriores es realmente importante la investigación de la posible correlación entre el polimorfismo del microsatélite en la región de la

transmembrana del gene MICA y el desarrollo de varias enfermedades asociadas al HLA-B y –C, incluidas en estas la enfermedad de Behcet, Salmonella artritis, la enfermedad de Kawasaki entre otras enfermedades infecciosas (Mizuki *et al.* 1997).

Zhang y colaboradores se dedicaron al estudio del polimorfismo del exón 2, 3 y 4 del gen MICA basándose en el polimorfismo en la posición 69 del exón 2 y en la posición 615-616 del exón 4 en una población de 103 norteamericanos caucásicos, los cuales no guardaban ninguna relación familiar. Lo que este grupo de trabajo encontró fue que de los 55 alelos conocidos del gene MICA, tan sólo dicha población presentaron 15 alelos los cuales se enumeran en la tabla siguiente:

Tabla 1: Frecuencias de alelos y genes de MICA en 103 norteamericanos caucásicos

Alelo	Frecuencia del alelo	Frecuencia del gene
MICA*001	2.9	0.015
MICA*002	28.2	0.153
MICA*004	10.7	0.055
MICA*007	7.8	0.040
MICA*008	66.9	0.426
MICA*009	4.6	0.076
MICA*0010	13.6	0.070
MICA*0011	4.9	0.025
MICA*0012	4.9	0.025
MICA*0016	1.9	0.010
MICA-0017D	4.9	0.025
MICA-0018D	6.8	0.035
MICA-0019D	4.9	0.025
MICA-0020D	1.9	0.010
MICA-0055D	1.0	0.005
Blanco	-	0.010

Otra cuestión que el estudio puso de manifiesto fue la relación entre la presencia de algunos alelos y diferentes alelos HLA-B. Esta relación se encuentra presente entre el alelo MICA*010 y el HLA-B*15, que es serológicamente equivalente al

B*62. Los alelos MICA*002 y MICA*007 están asociados con el HLA-B*27, además el alelo MICA*008 fue encontrado asociado a tres diferentes HLA-B (*07, *08 y *44) (Zhang *et al.* 2001).

El grupo de Zhang y colaboradores, en el 2002 llevó a cabo un análisis en tres tribus de indios sudamericanos (Toba, Wichi y Terena) pertenecientes al noreste de Argentina y al sur central de Brasil, el estudio del polimorfismo de los alelos MICA se hizo con 196 individuos no emparentados, se observó que de los 55 alelos distintos de MICA los indios sudamericanos sólo presentaron nueve y son *001, *00201, *004, *00801, *027, *00901, *00902, *010, *011 a diferencia de los 16 encontrados en americanos caucásicos *001, *00201, *004, *00801, *027, *00901, *00902, *010, *011, *00701, *01201, *016, *017, *018, *019, *047 estos datos sugieren que la distribución alélica de MICA esta más restringida en estas tribus (Zhang *et al.* 2002, Stephens 2002, Petersdorf *et al.* 1999).

En población coreana también existen estudios en los que se ha investigado la relación que existe entre la presencia de tripletes de GCT/AGC como lo son el A6 y A4 del gene MICA independientemente del HLA que presenta la población y se ha visto que hay una incidencia mayor de presentar el triplete A4 en personas que tienen diabetes tipo I en contraste con la baja incidencia del triplete A6 en esta misma enfermedad (Park *et al.* 2001).

Tian y colaboradores estudio el polimorfismo de MICA y su relación con el HLA-B en 29 familias Afro-Americanas, en este estudio fue empleada la técnica de PCR y SSOP. Ellos encontraron 12 alelos de MICA de los cuales MICA*008, MICA*004 y MICA*002 se presentaron en mayor proporción con una frecuencia de 28.2, 26.4 y 25.5 % respectivamente, también encontraron 38 combinaciones del haplotipo HLA-B-MICA. Estos datos sugieren que los alelos MICA pueden tener participación en la respuesta en transplantes alogénicos debido a la relación que presentan con el HLA-B (Tian *et al.* 2001).

3.5 POLIMORFISMO DEL GENE MICB

El gene MICB aunque en menor proporción que el gene MICA también es polimórfico y al igual que MICA se sospecha de su relación con padecimientos propios del HLA; por lo que diversos grupos de trabajo han estudiado a MICB con el fin de encontrar los diferentes alelos de éste y su relación con enfermedades.

En un estudio realizado por González y colaboradores, publicado en el 2003, analizaron la incidencia de los alelos de MICB en una población española, debido a que también a MICB se le ha asociado con la incidencia de enfermedades que son propias del HLA. Llevaron a cabo el estudio empleando la técnica de PCR y el sistema de secuenciación específica de primers como método para detectar los alelos de MICB. El estudio fue realizado en una población de 100 individuos españoles sanos que no guardaban ningún parentesco familiar entre ellos. La extensión del polimorfismo de los alelos de MICB fue bajo a lo esperado inicialmente y tan solo detectaron nueve alelos, de los cuales los más frecuentes fueron: MICB01021 (46%), MICB0103101 (13.5%), MICB0104 (13.5%) y MICB0106 (12.5%). Dada la relación que existe entre MICA y MICB este grupo de investigadores supone que MICB puede ser un potencial candidato que también tenga asociación con las enfermedades del HLA de clase I (González *et al.* 2002, Ando *et al.* 1997, Pellet *et al.* 1997, Stephens 2001):

3.6 POLIMORFISMO DEL GENE MICA Y SU ASOCIACIÓN EN PADECIMIENTOS

Se han realizado diferentes estudios poblacionales, en los cuales se analiza la presencia de los distintos alelos del gene MICA y su relación con enfermedades autoinmunes, además de la posible relación de este gene en la respuesta inmune en transplantes.

Mizuki y colaboradores estudiaron la relación del polimorfismo que se presenta en la región de la transmembrana del gene MICA en una población de 77 pacientes Japoneses que padecían la enfermedad de Behcet. Se observó una alta frecuencia de la presencia del alelo A6 en el grupo de pacientes con esta enfermedad en comparación con el grupo de control. De los pacientes con enfermedad de Behcet 44 eran B51 positivos y todos ellos poseían el alelo A6, 13 eran B51 negativos y poseían el alelo A6. Esta información indica que la asociación del alelo A6 en el gene MICA con la enfermedad de Behcet es fuerte como lo es el HLA-B51 con dicha enfermedad. Tomando lo anterior como base Mizuki y colaboradores concluyeron que puede existir alguna relación entre la presencia del gene MICA y el desarrollo de la enfermedad de Behcet (Mizuki *et al.* 1997).

En un trabajo realizado por Marín y colaboradores se estudio el polimorfismo en una población brasileña, además de analizar la relación del gene MICA con la enfermedad de Behcet en un grupo de pacientes brasileños. El estudio se realizó con muestras obtenidas de 200 brasileños sanos, encontrando los alelos de MICA siguientes:

Tabla 2: Alelos MICA encontrados en una población brasileña

Alelos MICA	Frecuencia del fenotipo (%)	Frecuencia del gene (%)
*001	3.5	1.8
*002g	28.5	15.4
*004	27.0	14.6
*006	1.5	0.8
*007g	2.5	1.3
*008g	47.0	27.2
*009	23.5	12.5
*010	11.0	5.7
*011	6.5	3.3
*012	2.5	1.3
*015	4.0	2.0
*016	4.5	2.3
*017	1.5	0.8
*018	5.0	2.5
*019	4.5	2.3
*029	0.5	0.3
*041	0.5	0.3
*043	0.5	0.3
Blanco	-	5.7

En los resultados consideraron como un grupo MICA*002g (*002, *020 y *023), MICA*007g (*007 y *026) y MICA*008g (*008, *027 y *048). MICA *008g mostró la frecuencia más alta con 47% seguido por MICA*002g, MICA*004 y MICA*009.

La relación entre MICA y alelos del HLA-B se observa en la tabla 3 donde se muestra la relación entre los distintos alelos de MICA y alelos del HLA-B, lo cual resulta de gran importancia para establecer si el vínculo que se observa tiene algo que ver con la presencia de algunas enfermedades (Marín *et al.* 2004).

Tabla 3: Relación entre alelos MICA y HLA-B en una población brasileña

MICA	HLA-B	Frecuencia de haplotipo
*002	35	0.063
*002	38	0.025
*004	44	0.065
*004	49	0.030
*008	7	0.083
*009	50	0.033
*009	51	0.075
*010	62	0.033
*011	65	0.030
*016	35	0.020

Por otro lado encontraron en un grupo de pacientes con enfermedad de Behcet, a los que se les determinó el HLA-B que de 33 pacientes 17 presentaban el HLA-B51, seis de los 33 pacientes presentaron al alelo MICA*006 y 10 presentaron el alelo MICA*009, pero además 3 de 200 personas sanas también presentaron el alelo MICA*006 y 47 de 200 el alelo MICA*009. Estos datos pueden sugerir que existe una posible relación del HLA-B51 y el alelo MICA*006 con el desarrollo de la enfermedad de Behcet, además de que es un antecedente para futuras investigaciones (Marín *et al.* 2004, Yabuki *et al.* 1999).

En 1999 Wallace y colaboradores demostraron que el alelo MICA*009 es expresado en mayor proporción en personas que padecen la enfermedad de Behcet que en individuos sanos. También encontraron que el alelo MICA*009 tiene una fuerte asociación con el alelo HLA-B51, y a este alelo se le asocia en otros estudios con la enfermedad de Behcet (Wallace *et al.* 1999).

Otro estudio poblacional desarrollado para indagar más sobre el polimorfismo de MICA y su relación con la enfermedad de Behcet fue desarrollado por Picco y colaboradores; el estudio se realizó en 18 pacientes que presentaban de manera completa e incompleta la enfermedad de Behcet juvenil además de contar con 20 individuos sanos como control (todos ellos italianos). A todos los individuos que participaron en el estudio se les determinó el HLA-B dando como resultado que 10

de las personas que presentaban la enfermedad de Behcet eran HLA-B51 y siete pacientes presentaron el alelo MICA A6. Los pacientes con la enfermedad presentaron el alelo MICA A6 en un 70% en comparación con los individuos de control que lo presentaron en un 25% (Picco *et al.* 2002, Park *et al.* 2001, Gambelunghe *et al.* 1999, Gambelunghe *et al.* 2001).

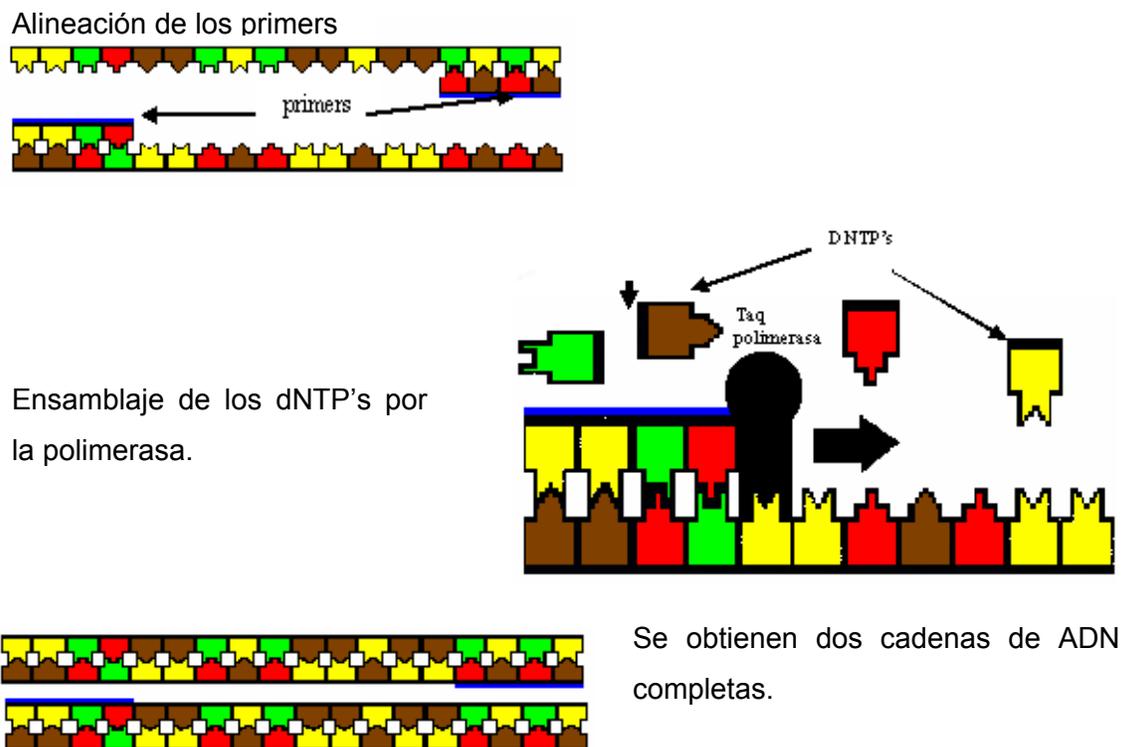
3.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Al igual que prácticamente todos los procesos metabólicos, la replicación del ADN esta controlada por enzimas, dichas enzimas se denominan polimerasas. Los métodos más recientes de la tecnología del ADN recombinante y de la secuenciación de nucleótidos han permitido la determinación de la secuencia de nucleótidos de muchas de estas regiones clave en el ADN y ARN. La evidencia autorradiográfica nos lleva a creer que la replicación se da simultáneamente en ambas cadenas. La replicación continua es posible, naturalmente, en la cadena molde 3' → 5'. En la cadena complementaria tiene lugar una forma de replicación discontinua, mediante la cual se van replicando pequeños segmentos desde la unión Y hacia atrás. Estos segmentos cortos, llamados fragmentos de Okasaki tienen por término medio 1500 nucleótidos en procariotas y 150 en eucariotas. La cadena sintetizada continuamente se denomina cadena adelantada y la cadena sintetizada discontinuamente se llama cadena retrasada (Tamarín, 1996, Lewin, 2001).

La PCR es un rápido procedimiento in vitro para la amplificación enzimática de un segmento específico de ADN, el uso de una ADN polimerasa estable al calor de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* elimina la necesidad de añadir nueva enzima después de cada etapa de desnaturalización térmica. Así cada ciclo se controla sencillamente variando la temperatura (Voet y Voet, 1996).

El número de aplicaciones del PCR es muy grande. Estas incluyen la clonación a partir de ADN genómico, ingeniería de ADN, identificación genética a partir de muestras forenses, análisis de variaciones de secuencias alélicas, huellas génicas y directamente en la secuenciación de nucleótidos de ADN genómico. En la reacción en cadena de la polimerasa la amplificación del ADN se basa en una serie de rompimientos de la cadena de ADN a partir de calentamiento y un sucesivo enfriamiento en presencia de ADN, polimerasa, un exceso de nucleótidos y primers que son específicos para el segmento que se desea amplificar, como se muestra en la figura 4. El primer ciclo es caracterizado por la formación de un producto de longitud indeterminada; sin embargo, el segundo ciclo produce cadenas cortas que son acumuladas exponencialmente sucesivamente en cada ciclo de la amplificación. De esta manera se obtiene en gran cantidad el segmento que se desea amplificar después de 20 a 30 ciclos de calentamiento y enfriamiento (Pardo, 1999).

Fig. 4: Reacción en cadena de la polimerasa.



4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El complejo mayor de histocompatibilidad, se encuentra localizado en el cromosoma 6 humano. Es una región de genes muy polimórficos que cuentan con más de 500 alelos diferentes y precisamente su combinación permite que se expresen diversas moléculas en la superficie celular que hacen que todos seamos diferentes y se reconozca lo propio de lo extraño, (se puede decir que están relacionados con el rechazo a lo extraño, como en el caso de los trasplantes así como enfermedades autoinmunes en las cuales ese reconocimiento propio no se da). En este mismo cromosoma se encuentra un gene poco común que codifica la molécula MICA, es de gran longitud (11722 pb) y se encuentra localizado aproximadamente a 46 kilobases (kb) del centrómero en dirección al locus HLA-B. Está constituido por 6 exones, los exones 2, 3 y 4 codifican para los tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) de la proteína madura y presentan un amplio polimorfismo. Por su ubicación este gene se encuentra muy relacionado con los genes de los antígenos leucocitarios humanos (HLA), los cuales pertenecen al CMH.

La importancia del gen MICA radica en que se ha demostrado que la presencia de algunos alelos esta asociada con enfermedades como la espondilitis anquilosante, la psoriasis, el síndrome de Reiteris, la diabetes mellitus tipo I y la enfermedad de Behcet. Incluso, se ha encontrado cierta especificidad alélica particularmente relacionada con alelos HLA-B o HLA-C. En todas estas enfermedades existe un daño del tejido conectivo o epitelial, lo que sugiere la participación de algún agente tejido específico adicional a los que ya se han asociado con el HLA. Recientemente, un grupo de trabajo japonés y otro griego han evidenciado de manera independiente la asociación de MICA con la enfermedad de Behcet más que con el alelo B51 que generalmente se asume como el componente de este tipo de enfermedad. De manera adicional a los estudios en la enfermedad de Behcet, datos recientes han mostrado la presencia de MICA o B57 en otras

enfermedades inflamatorias crónicas como la uveítis, la psoriasis y la artritis reumatoide.

De hecho, la localización de los genes MIC (MICA y MICB) su estructura y la expresión de las moléculas de estos genes en ciertos tipos celulares son una base importante para suponer cierta susceptibilidad a enfermedades dependiendo del alelo expresado.

Como consecuencia de la variedad de métodos empleados y las dificultades técnicas para determinar el polimorfismo de MICA, existe poca información con respecto a la frecuencia de los alelos de MICA en diferentes grupos étnicos. No obstante existen estudios en los que se ha determinado el gran polimorfismo de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA en Norteamericanos caucásicos, Japoneses, Coreanos, Chinos, Tailandeses, Indios sudamericanos, Africanos-americanos y Brasileños.

Por lo anterior, se consideró de gran importancia establecer un método que permita detectar las variaciones de los alelos de forma unificada, así como realizar un mayor número de análisis que permitan clarificar la distribución de los alelos de los genes MIC en poblaciones de diferentes orígenes, especialmente la mexicana.

Evidentemente, esta identificación de nuevos alelos ha estado motivada por el creciente interés en conocer la asociación de esta nueva familia de genes en estudios de poblaciones, su vínculo con los genes HLA-B, debido a su cercanía, y en consecuencia su participación en diversos padecimientos como se menciono anteriormente.

En el presente trabajo se amplificaron precisamente los exones más polimórficos del gene MICA, los exones 2, 3 y 4, de una población mestiza mexicana, mismos que serán utilizados posteriormente para realizar su caracterización molecular y

por lo tanto conocer las variantes alélicas presentes en nuestra población, además también se realizó el análisis estadístico del lugar de origen de los parientes de los donantes, así como de los padecimientos presentados. Esta información servirá para dar seguimiento con el estudio del gene MICA puesto que se sabrá de que parte del país proviene y que padecimientos presenta la población, para poder investigar la relación de estas enfermedades con la expresión de los alelos que se lleguen a encontrar.

Precisamente, la importancia del presente trabajo radicó en su contribución al establecimiento de una técnica confiable y reproducible que permitirá el conocimiento de la distribución de estos alelos en la población mexicana y al entendimiento de sus relaciones con HLA y algunas enfermedades, así como al rol de MICA en la compatibilidad de trasplantes, análisis de población y estudios de diversidad humana. Además de lo anterior el trabajo abre la posibilidad para que se desarrollen estudios donde se compare con otros grupos étnicos presentes en nuestro país, posibilitando el avance de la ciencia así como también en la aplicación de la posible asociación de algunos alelos a enfermedades específicas de nuestra población, para ayudar a facilitar un diagnóstico molecular de predisposición.

5. OBJETIVO GENERAL

Realizar la amplificación de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA utilizando ADN extraído de sangre de una población mestiza mexicana.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Obtener ADN de 100 personas sanas de una población mestiza mexicana.

- * Estandarizar la técnica de PCR para la amplificación de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA.

- * Realizar la amplificación de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA por medio de la PCR.

- * Realizar la electroforesis de los exones 2, 3 y 4 amplificados por PCR del gene MICA.

- * Realizar el análisis estadístico del lugar de origen de padres y abuelos de los donantes.

- * Realizar el análisis estadístico de las enfermedades presentadas por lo padres y abuelos de los donantes.

6. HIPÓTESIS

Recientemente se ha descubierto una familia de genes altamente polimórfica llamada MIC, la cual se encuentra muy cercana del complejo mayor de histocompatibilidad. Entre ellos el gene MICA ha sido estudiado y se ha evidenciado que la presencia de algunos alelos, está relacionada con el rechazo a lo extraño, como transplantes así como con enfermedades autoinmunes. También sabemos que como consecuencia de la variedad de métodos empleados y las dificultades técnicas para determinar el polimorfismo de MICA, existe poca información con respecto a la frecuencia de los alelos de MICA en diferentes grupos étnicos, tal es el caso de la población mestizo-mexicana.

Por lo anterior, si establecemos la técnica para la amplificación de los exones 2, 3 y 4, los mas polimórficos del gene MICA provenientes de una muestra de la población mestizo-mexicana estaremos en posibilidad de determinar las variantes alélicas de estos exones que esperamos sean diferentes a los caracterizados para otras poblaciones, lo que permitirá no solo establecer las diferencias sino confirmar o encontrar nuevas correlaciones de variantes alélicas con diferentes enfermedades autoinmunes.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Población:

Se utilizaron 103 personas sanas, mestizo-mexicanas y que sean mayores de 18 años. Para su inclusión en el estudio se utilizó el criterio establecido por Vargas y colaboradores. Ellos definen a una población mestiza mexicana como aquellos individuos cuyos padres y abuelos hayan nacido en la República Mexicana (Vargas *et al.* 2002).

Criterios de inclusión:

- Individuos sanos
- Que tengan una edad entre 18 y 50 años de edad
- Sexo indistinto
- Que sus padres y abuelos hayan nacido en la República Mexicana
- Que al momento de la toma de muestra sanguínea no padezcan alguna enfermedad o tome medicamento

Variable:

El tamaño del exón a amplificar.

Material y equipo:

- Agujas *Vacutainer*
- Soporte* Vacutainer*
- Tubo *Vacutainer con EDTA
- Ligadura
- Tubos cónicos de 50 mL *Falcon
- Tubos cónicos de 15 mL

- Pipetas pasteur
- Pipetas graduadas de 2 mL
- Pipetor *Drummond pipet-aid
- Tubos *Eppendorf de 1.5 mL
- Tubos para PCR de 200 μ L
- Gradilla para tubos de 200 μ L
- Micropipetas de 20, 200 y 1000 μ L *Gilson
- Puntas para micropipetas
- Campana de flujo laminar
- Centrifuga
- Ultracentrifuga con sistema de enfriamiento
- Refrigerador
- Congelador
- Termociclador * M.J. Research PTC-200 Cyclor
- Balanza analítica *Ohaus Voyager
- Agitador vortex *Daigger vortex Co.
- Cámara de electroforesis *Owl
- Liofilizador *Savant Automatical Enviromental
- Transiluminador
- Software para imágenes *UVP
- Cámara para geles *UVP

Soluciones y Reactivos:

- Solución hipotónica (ver anexo)
- Solución salina al 0.9 % (ver anexo)
- Solución TBE 0.5X (ver anexo)
- DNAzol *Invitrogen
- Alcohol etílico absoluto
- Alcohol etílico al 70 %
- Primers

Exón 2 5': TCT TGT CCC TTT GCC CGT GTG CAT
Exón 2 3': CCC CCA TTC CTC ACC CCC AGC CTG
Exón 3 5': TGG GGG AGG GCC AGG GAG GCG TAC
Exón 3 3': CGA TGT GCC AAC AGG AAA TGC CTT
Exón 4 5': CAG ACT TGC AGG TCA GGG GTC CCG
Exón 4 3': CAA TGA CTC TGA AGC ACC AGC ACT

-dNTPs *Fermentas

-Agua inyectable

-Agua milliq

-Taq *Amplificasa

-MgCl₂ 50 mM

-Buffer (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 10 µg /mL)

-Colorante de carga

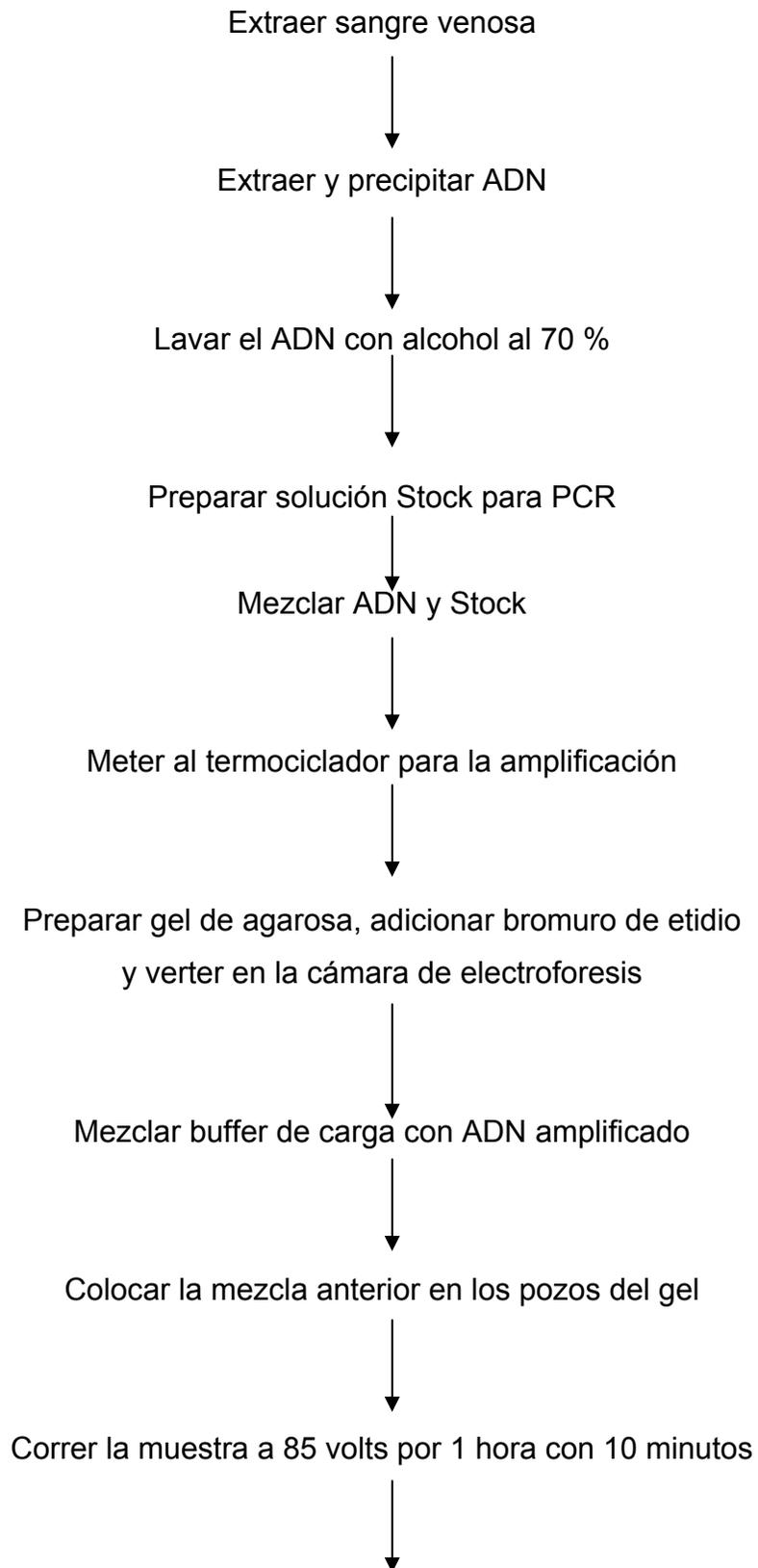
-Agarosa *Invitrogen

-Bromuro de etidio 10 mg/mL *Promega

- Marcador de pesos moleculares *Invitrogen

* Marca registrada

8. DIAGRAMA DE FLUJO



Sacar el gel y observar en el transiluminador las bandas



Fotografiar y guardar la imagen del gel



Realizar el análisis densitométrico



Inactivar el gel de agarosa y desechar

9. METODOLOGÍA

9.1 TÉCNICA PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN esta basada en el empleo de un detergente en solución que permite la precipitación selectiva de ADN a partir de células lisadas, y el ADN es precipitado con etanol.

1.- Extraer 5 mL de sangre venosa con tubo vacutainer utilizando EDTA como anticoagulante, marcar el tubo con número consecutivo.

2.- Centrifugar la muestra a 3500 rpm durante 10 minutos para separar el plasma y obtener el paquete celular.

3.- Retirar el plasma con la ayuda de una pipeta Pasteur y desecharlo. Colocar la pipeta sucia en un recipiente con cloro.

4.- Hacer tres lavados con solución salina estéril al 0.9 % de 2 mL cada lavado y juntar los tres lavados en un tubo cónico de 15 mL.

5.- Centrifugar 10 minutos a 3500 rpm, retirar el sobrenadante con mucho cuidado con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Con la misma pipeta extraer la capa de blancos y colocarla en un tubo cónico de 50 mL.

6.- Adicionar 20 mL de solución hipotónica estéril, agitar y esperar 20 minutos.

7.- Centrifugar a 4000 rpm, 4° C durante 10 minutos, desechar el sobrenadante y repetir la operación dos veces más.

8.- Desechar el sobrenadante y al botón de células blancas que queda adicionar con una pipeta estéril un mililitro de DNAzol y homogenizar.

9.- Transferir a un eppendorf de 1.5 mL y centrifugar a 10 000 rpm a 4° C durante 10 minutos.

10.- Transferir 500 µL por duplicado a un eppendorf de 1.5 mL y adicionar 1 mL de alcohol absoluto frío e invertir el eppendorf para favorecer la precipitación del ADN.

11. Dejar reposar toda la noche.

12.- Centrifugar cada eppendorf a 10 000 rpm 4° C durante 10 minutos, desechar el sobrenadante y adicionar 1 mL de alcohol al 70 %.

12.- Resuspender el ADN y centrifugar a 10 000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Desechar el sobrenadante, repetir la operación una vez más.

13.- Adicionar una última vez alcohol al 70 % y guardar 20° C bajo cero hasta su uso.

14.- Decantar el alcohol y pasar los tubos al liofilizador *Speedvac durante 10 minutos para eliminar el exceso de alcohol. Si es necesario repetir la operación.

15.- Una vez seco el ADN añadir 1 mL de agua milliq estéril. En este punto esta listo para su uso y se puede guardar a 20° C bajo cero.

9.2 TÉCNICA PARA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR es un procedimiento in vitro para la amplificación de fragmentos de ADN, esta técnica se basa en la adición de una polimerasa estable al calor la cual junto con otros reactivos va a replicar el fragmento de ADN que nos interesa además esta técnica tiene gran aplicación como lo es en el caso de la clonación y en estudios genéticos (Pardo, 1999).

1.- Preparar un Stock que contiene amortiguador de reacción 10X (KCl 500 mM, TRIS-HCl pH 8.3, 100mM, gelatina 10 µg/mL), 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 12.5 pmol de cada primers y 0.75 UI de *Taq* polimerasa de ADN y agua inyectable (cbp 25 µL por reacción).

2.- Se coloca 2.5 µL de ADN disuelto en agua (10-100ng de ADN) en un tubo para PCR con la ayuda de una micropipeta y agregar 22.5 µL del Stock preparado anteriormente.

Condiciones típicas de una reacción para 25 µL:

Reactivo	µL
Amortiguador 10X	2.5
MgCl ₂ 20X (2.0mM final)	1.67
dNTP's (0.2mM final)	0.5
Primers 25pmol/µL	
3'	0.5
5'	0.5
Agua inyectable	cbp 25µL
Taq polimerasa 5 unidades/µL	0.15 µL
DNA (10-100ng final)	2.5

3.- Una vez hecho lo anterior pasar los tubos para PCR al termociclador y utilizar el programa para MICA.

Condiciones de amplificación en el termociclador para MICA:

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1(desnaturalización)	95	4 min.
2(desnaturalización)	95	30 s
3(alineamiento)	65	50 s
4(duplicación)	72	30 s
5	repetir pasos 2 - 4, 32 veces	
6(extensión)	72	8 min.
7	15	por siempre

9.3 TÉCNICA PARA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa es un método utilizado en la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN, esta técnica es rápida y simple y es capaz de separar fragmentos de ADN que por otros procedimientos no se pueden definir adecuadamente. Los geles de agarosa pueden ser revelados mediante la adición de una sustancia como el bromuro de etidio que se intercala con los fragmentos de ADN y los hace visibles a la luz ultravioleta. Los geles de agarosa usualmente se corren de manera horizontal en un campo eléctrico en una dirección y voltaje constante (Sambrook, 1989).

1.- Pesar 1 g de agarosa y adicionar en 100 mL de TBE 0.5X, calentar para disolver.

2.-Añadir a la solución anterior 3 μ L de bromuro de etidio y homogenizar perfectamente.

3.- Agregar a la cámara de electroforesis la solución de agarosa, la cual ya tiene puestos los peines para marcar los pozos, tapan la cámara y dejar solidificar por espacio de 30 minutos.

4.- Una vez solidificado el gel adicionar TBE 0.5X hasta cubrir por completo el gel, retirar los peines con cuidado.

5.- Mezclar 4 μ L de las muestras amplificadas sobre papel parafilm con 4 μ L buffer de carga con la ayuda de una micropipeta de 20 μ L.

6.- Colocar en el pozo número uno los pares de bases y en el pozo siguiente el blanco, y a partir del tercer pozo empezar a colocar las muestras amplificadas.

7.- Pasar una corriente de 85 Volts por espacio de una hora con diez minutos.

8.- Observar en el transiluminador el progreso de la electroforesis.

9.- Tomar las fotos necesarias con el programa UVP.

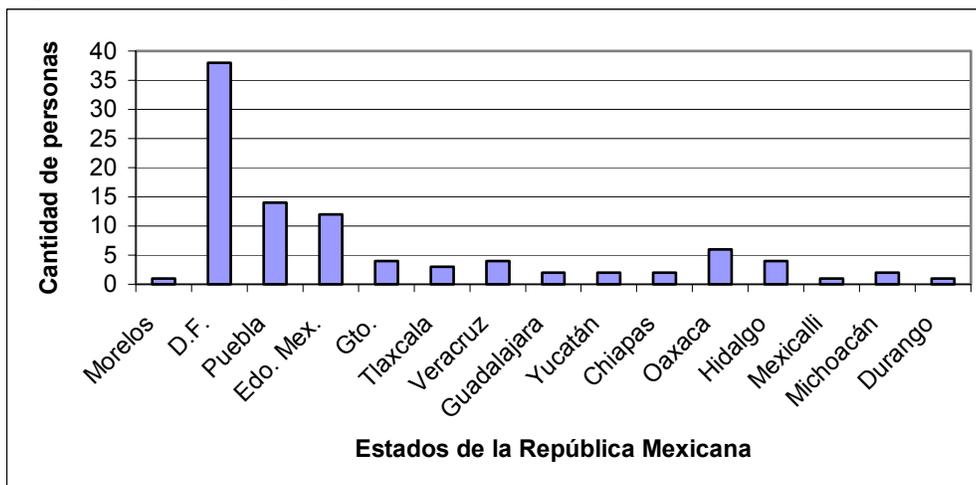
10.- Inactivar el gel.

10. RESULTADOS

10.1. Análisis estadístico del lugar de origen.

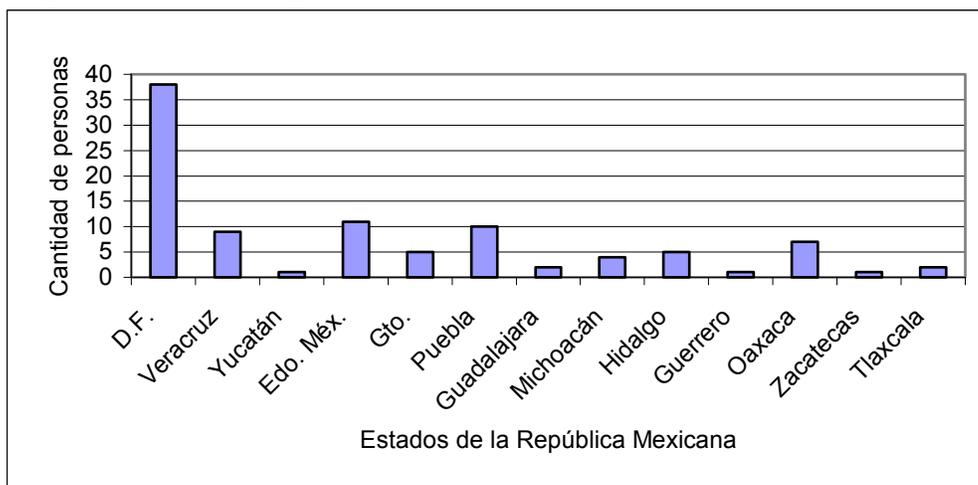
En el análisis estadístico de los Padres de los donantes observamos que en su mayoría provienen del D.F., seguido en importancia por el estado de Puebla y el estado de México.

Figura 5: Estado de origen del Padre.



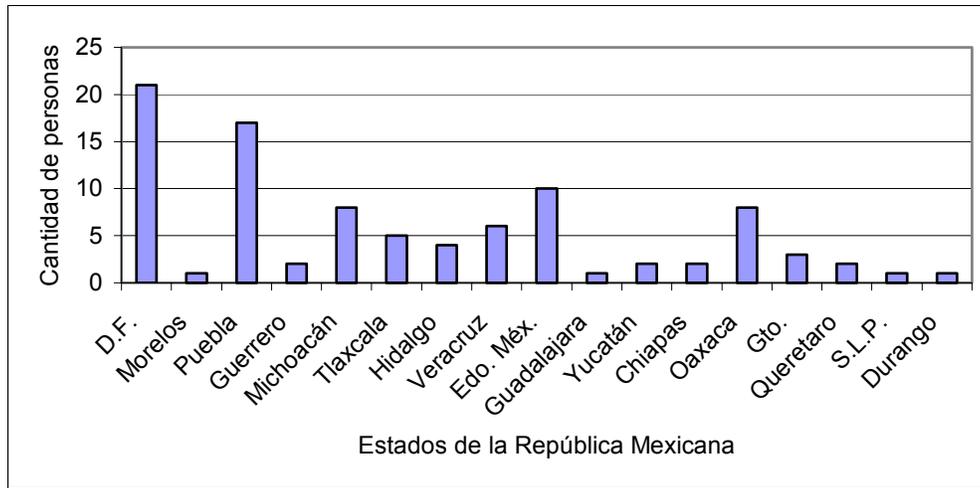
En el caso de las Madres de los donantes, la mayoría son del D.F.

Figura 6: Estado de origen de las Madres.



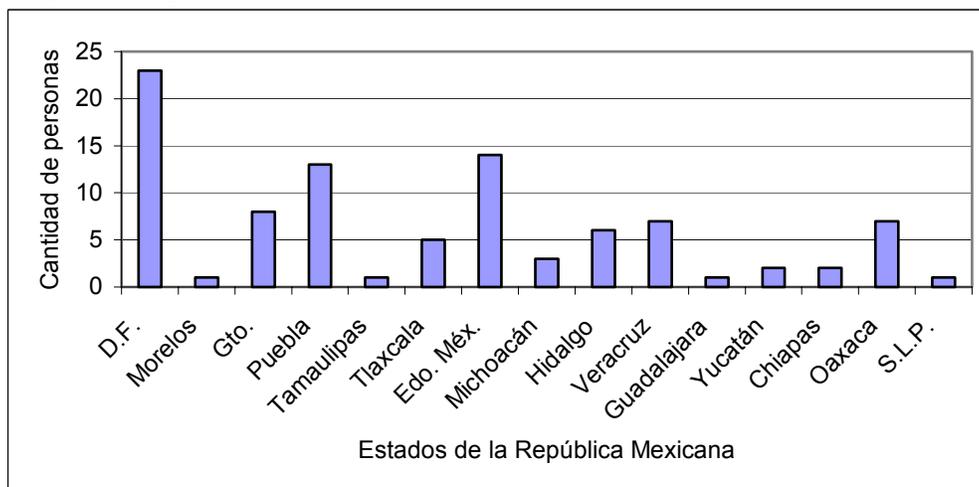
En esta figura se muestra el origen del abuelo paterno.

Figura 7: Origen del abuelo paterno



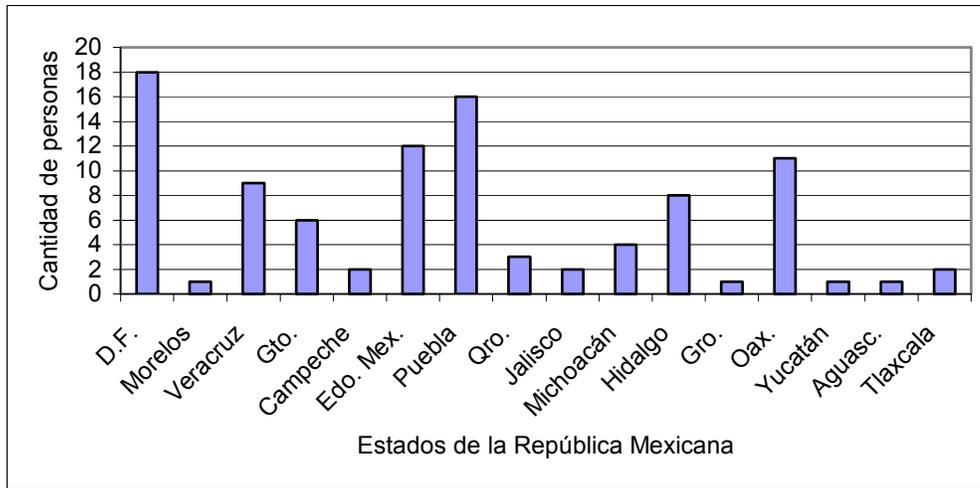
En la figura 8 se muestra el origen de las abuelas Paternas.

Figura 8: Origen de la abuela paterna



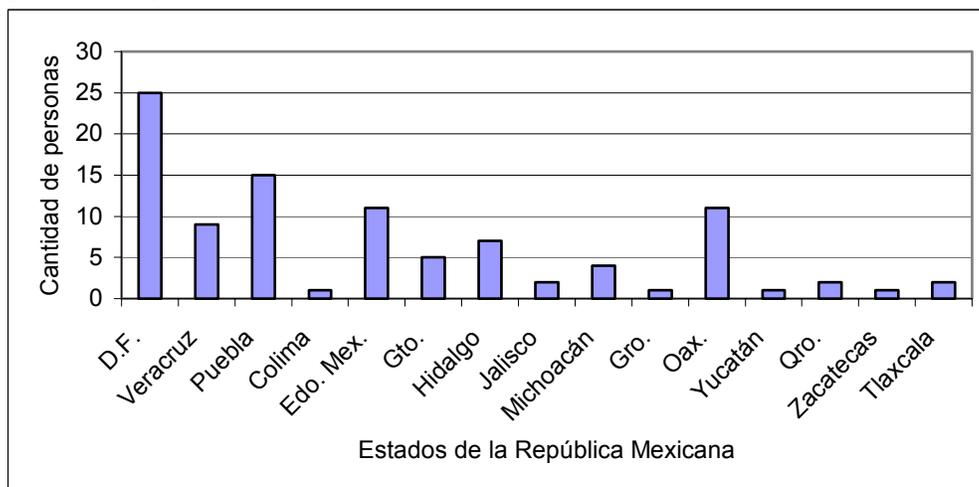
En la siguiente figura se muestra el origen del abuelo Materno.

Figura 9: Origen del abuelo materno



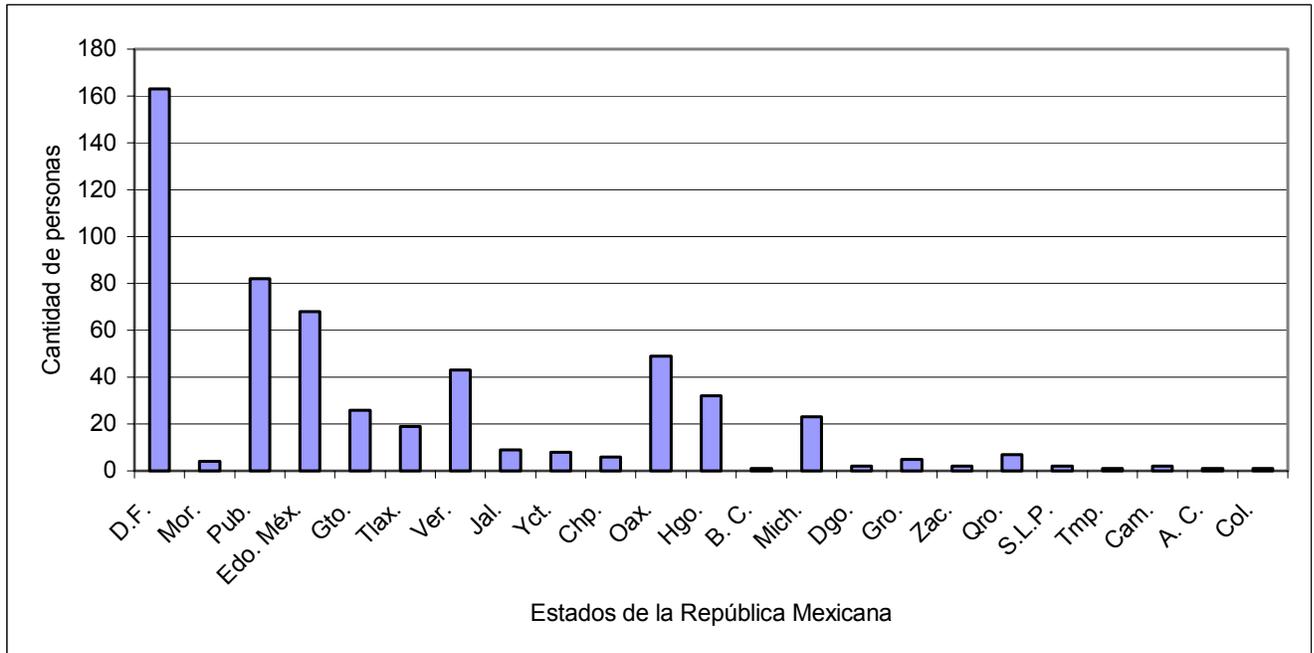
En la figura 10 se muestra el origen de las abuelas Maternas.

Figura 10: Origen de la abuela materna



Y finalmente en la figura siguiente se muestra el origen en general de los parientes de los donantes, observándose que la mayoría son del D.F, Estado de México, Puebla y Oaxaca.

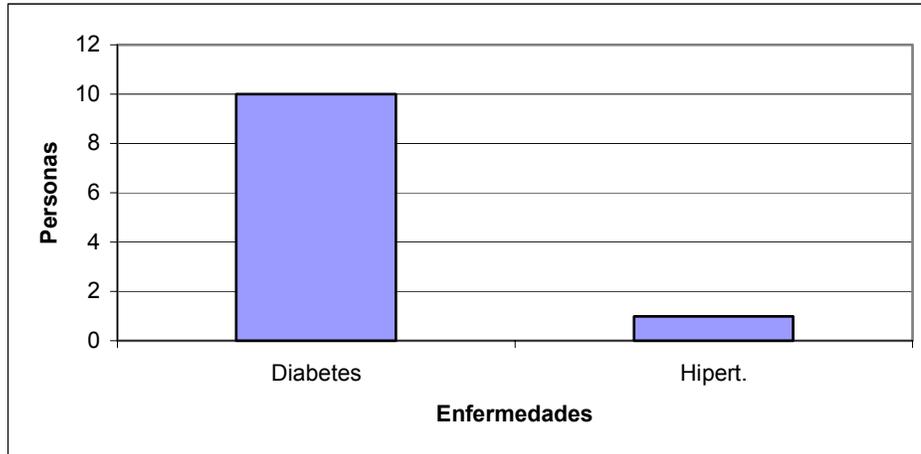
Figura 11: Se muestra de forma general el origen de los parientes de los donantes.



10.2. Análisis estadístico de padecimientos.

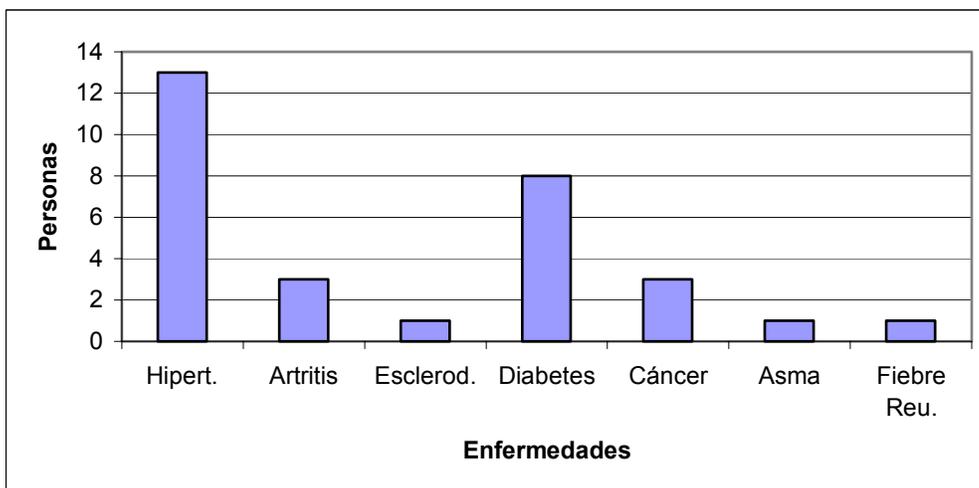
Con respecto al análisis de los principales enfermedades de los padres y abuelos de los donantes, en la figura siguiente se muestran las enfermedades que presentaron más comúnmente los Padres los donantes, que en este caso únicamente fueron diabetes e hipertensión.

Figura 12: Padecimientos del Padre.



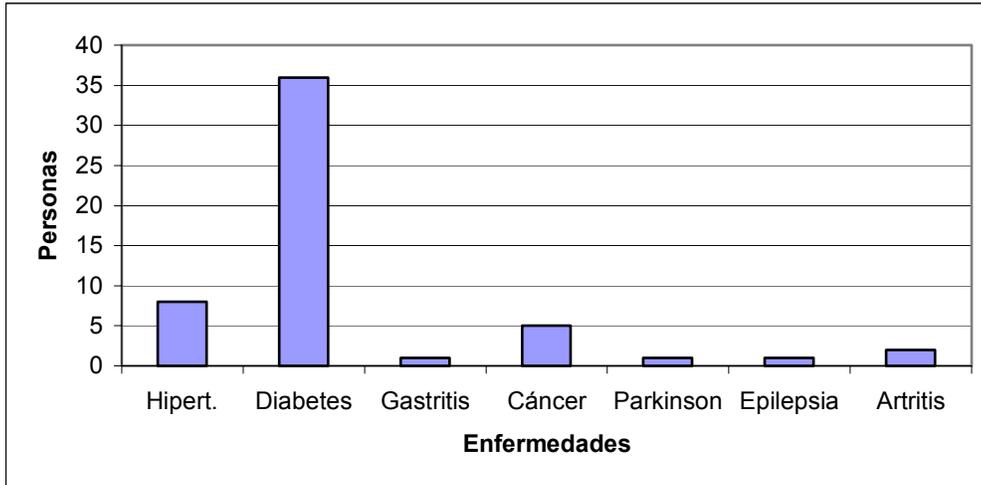
En la figura de abajo se muestra la tendencia hacia ciertos padecimientos en las Madres de los donantes, aquí se observa que presentan muchos más padecimientos que en el caso de los Padres.

Figura 13: Padecimientos de las Madres de los donantes.



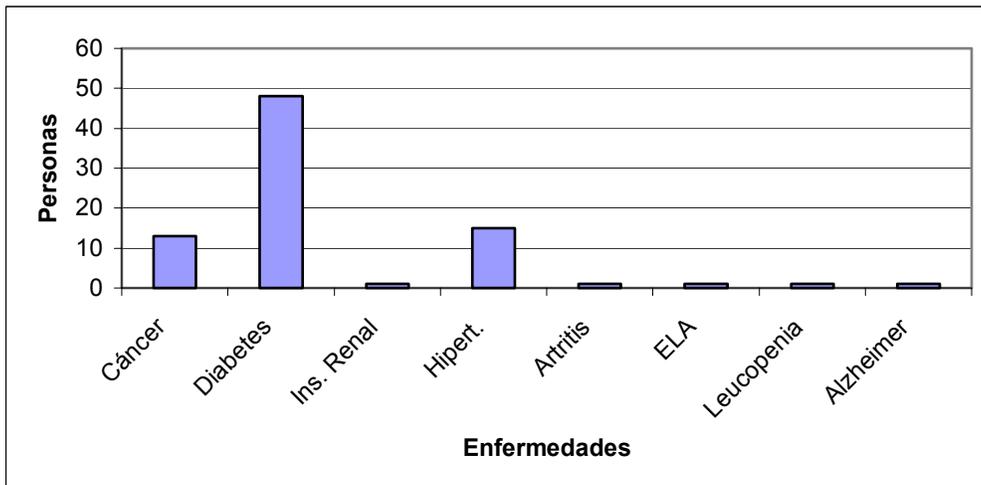
En seguida se muestran los padecimientos de los abuelos de los donantes en donde se observa una mayor tendencia hacia la diabetes.

Figura 14: Enfermedades presentadas por los abuelos



Los padecimientos más frecuentes de las abuelas de los donantes fueron la diabetes, la hipertensión y el cáncer en sus diferentes formas.

Figura 15: Enfermedades más observadas en las abuelas.



10.3. Estandarización del PCR

En la siguiente tabla se muestran las cantidades adecuadas de cada componente para llevar a cabo la amplificación de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA. La cantidad necesaria de ADN para el PCR resulto ser de 10-100ng por lo que variando el volumen de las muestras ajustábamos la concentración.

Tabla 4

Reactivo	μL
Amortiguador 10X	2.5
MgCl ₂ 20X (2.0mM final)	1.67
dNTP's (0.2mM final)	0.5
Primers 25pmol/μL	
3'	0.15
5'	0.15
Agua inyectable	cbp 25μL
Taq polimerasa 5 unidades/μL	0.15 μL
ADN (10-100ng)	2.5

Cabe hacer notar que las cantidades arriba listadas no fueron las indicadas para todas las muestras, ya que en algunos casos, como fue en ciertas muestras del exón 3 y en el exón 4 fue necesario cambiar la cantidad de primers y la cantidad adicionada de la muestra. Quedando de la siguiente forma:

Tabla 5

Reactivo	μL
Amortiguador 10X	2.5
MgCl ₂ 20X (2.0mM final)	1.67
dNTP's (0.2mM final)	0.5
Primers 25pmol/μL	
3'	0.5
5'	0.5
Agua inyectable	cbp 25μL
Taq polimerasa 5 unidades/μL	0.15 μL
ADN (10-100ng)	10-15

10.4. Electroforesis

En lo referente a la electroforesis en gel de agarosa se estableció que para tener una buena separación se necesitaba manejar las condiciones siguientes:

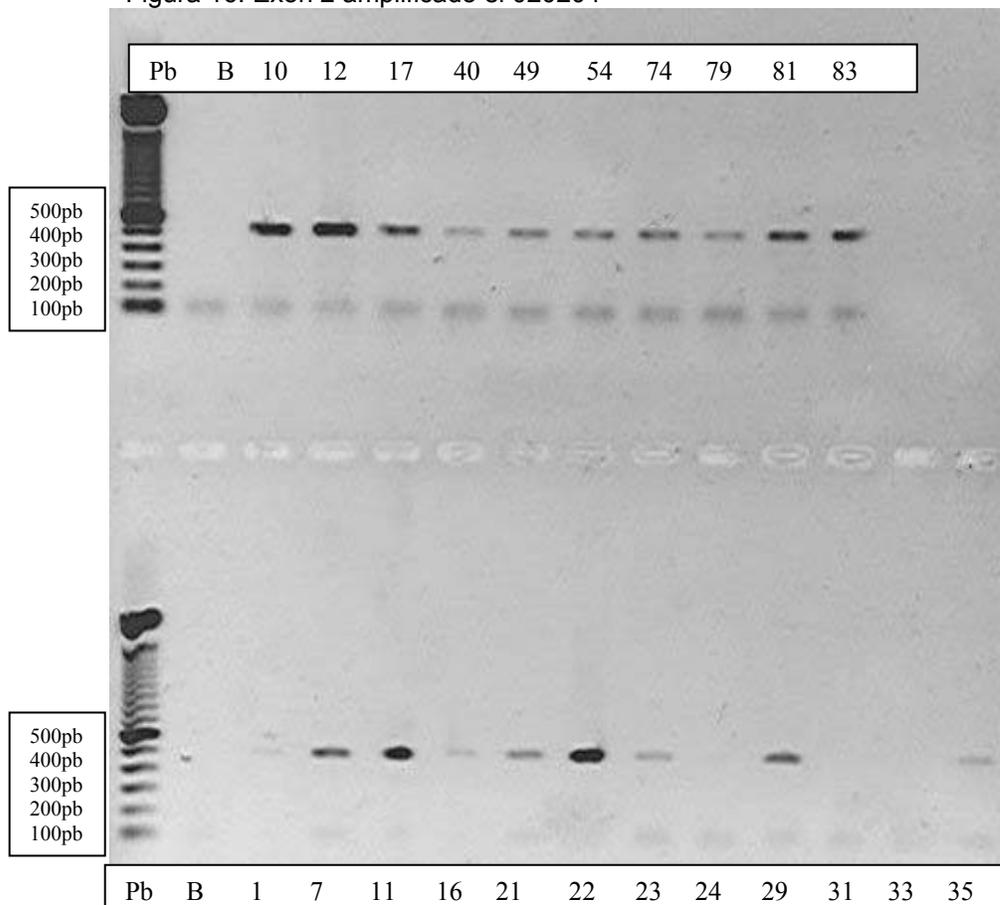
Tabla 6

Parámetro	Condición
Voltaje	85 Volts
Tiempo	1 hora con 10 minutos
Cantidad de Bromuro de etidio (10mg/mL)	2.5 μ L

10.5. Bandas obtenidas de los amplificadores

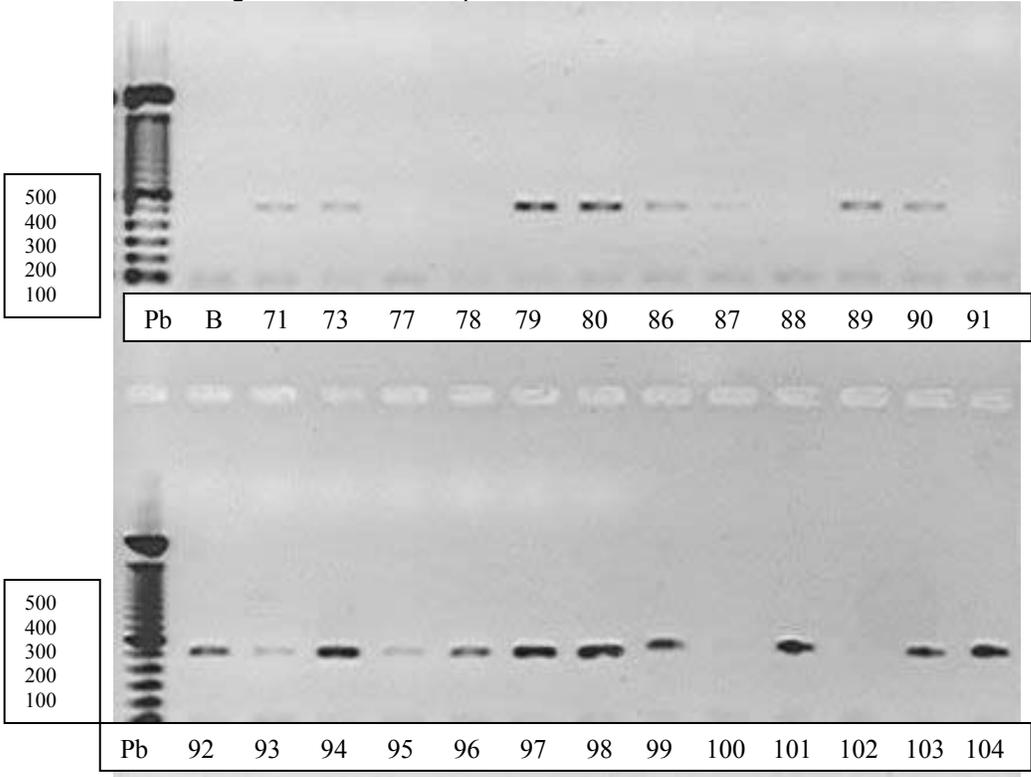
En la figura siguiente se muestra la amplificación de algunas muestras para el exón 2 que se corrieron en las condiciones antes citadas.

Figura 16: Exón 2 amplificado el 020204

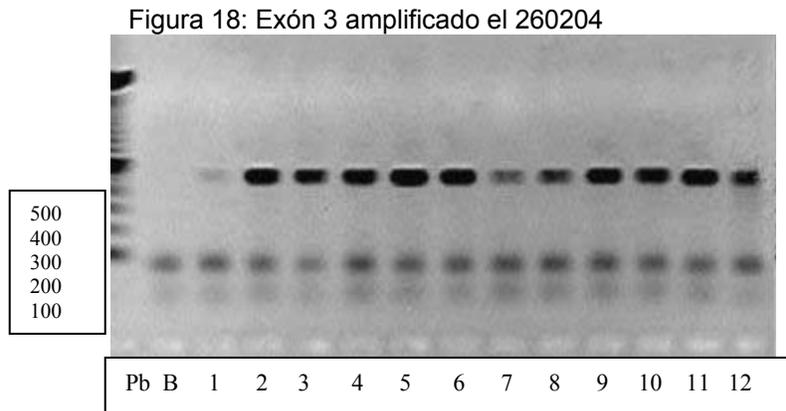


La figura indica las muestras del exón 2 que se amplificaron el día 09 de Diciembre del 2003.

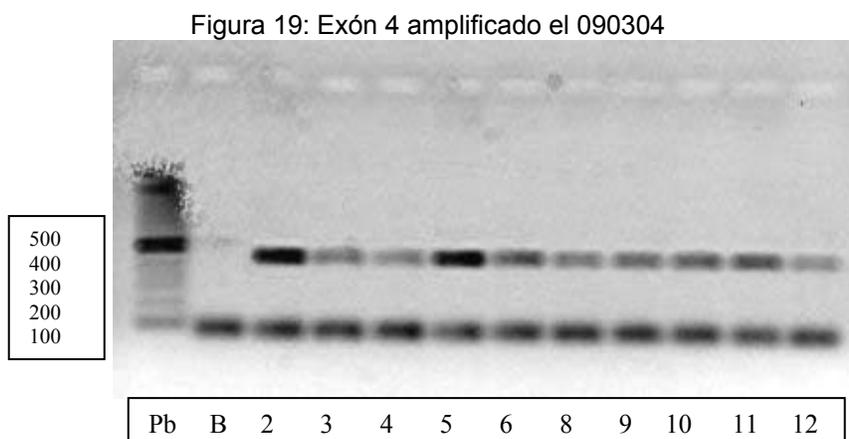
Figura 17: Exón 2 amplificado el 091203



En la figura siguiente se muestran algunas muestras amplificadas para el exón 3. La electroforesis fue realizada el día 26 de Febrero del 2004.

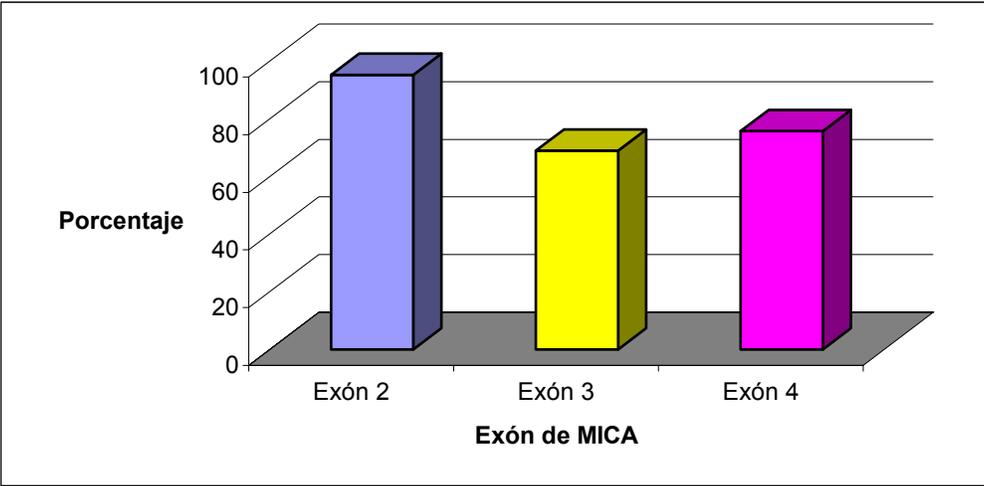


En la figura 19 se muestran los amplificados del exón 4, realizado el día 09 de Marzo del 2004.



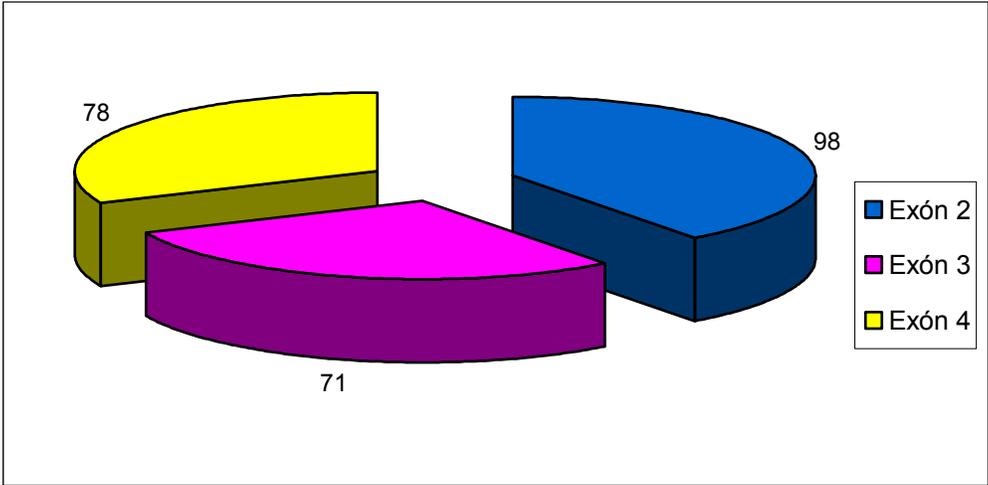
En la figura 20 se muestra el porcentaje de cada exón que amplificó con las condiciones antes descritas para cada exón. Para el exón 2 tenemos el 95.14 %, para el exón 3, el 68.93 % y para el exón 4 se obtuvo el 75.7 %.

Figura 20: Porcentaje de los exones 2, 3 y 4 amplificados.



En seguida se observa en la figura 21 la cantidad muestras amplificadas de los tres exones.

Figura 21: Muestras amplificadas de los tres exones.



10.6. Análisis densitométrico.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis densitométrico para los tres exones del gene MICA. El análisis se realizó con el programa UVP con el fin de conocer la eficiencia del PCR.

Tabla 7 Análisis densitométrico de los tres exones

Núm.	Exón 2	Exón 3	Exón 4	Núm.	Exón 2	Exón 3	Exón 4
1	7.94902	10.2297	17.6025	27	7.03067		
2	30.799	54.824	66.8668	28	16.7616	30.7894	39.8409
3	33.5739	40.5865	31.8792	29	17.209	13.6472	5.25425
4	51.0686	31.9188	24.549	30	14.7921	15.8717	26.4032
5	79.0913	54.2038	75.0347	31	2.6282	11.9211	10.4981
6	65.376	50.4498	50.4705	32	8.44803	9.22321	7.79735
7	17.8516	6.49866	10.659	33	14.8555		
8	11.7694	23.4071	37.7101	34	2.64035		
9	23.2475	39.1186	36.8186	35	1.01045	12.2567	21.9027
10	19.293	32.48	41.5778	36	3.93943		3.78583
11	25.8153	48.3969	57.2895	37	7.72917	12.7552	8.72795
12	25.817	48.18	42.3931	38	15.4787	31.9702	6.67947
13	13.4342	18.5065	31.7578	39	2.68565		2.42859
14				40	4.24804	3.6413	22.1257
15	44.4742	15.983	7.23269	41	17.3896	27.3155	27.0736
16	5.7346	2.0219	2.69289	42	0.99976		1.44645
17	13.3714	3.47	8.21453	43	3.59634	18	26.0148
18				44			
19	4.38465			45	14.5861	21.7269	28.4922
20	3.81886			46	42.513		
21	3.22102	14.2186	26.6247	47	5.66242	2.98485	
22	5.47565	18.8512	29.8142	48	1.1713		
23	1.66872	8.56494	26.6786	49	1.56242	14.9232	10.7283
24	5.75683			50	18.5303	6.9838	23.2435
25	8.52186	4.4881	12.5338	51	3.71597	2.16505	6.51753
26	9.7509	10.2024	17.95	52	16.3739	14.7993	29.0227

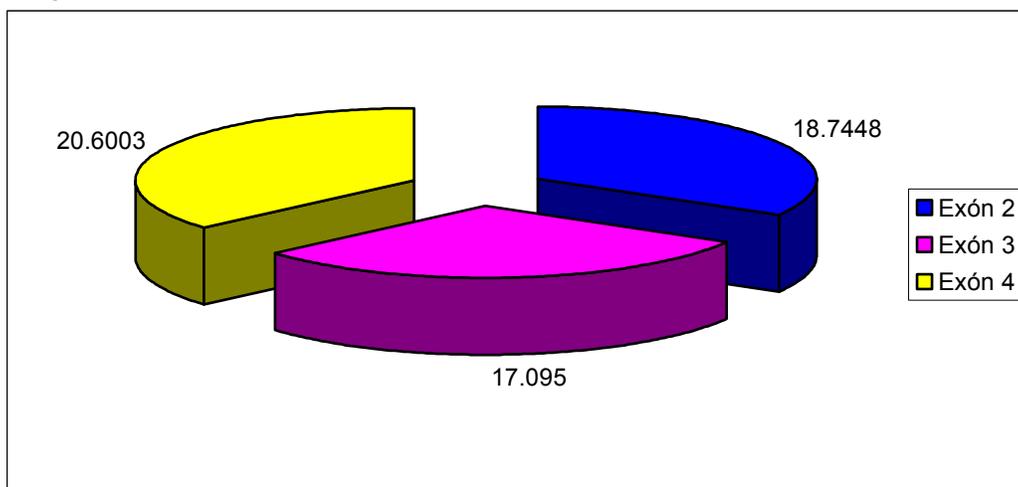
Núm.	Exón 2	Exón 3	Exón 4	Núm.	Exón 2	Exón 3	Exón 4
53	10.4285	7.20155	27.9169	80	38.5566	29.6461	15.5068
54	6.12582	13.6472	14.6807	81	3.37081		
55	23.2668	33.062	49.3943	82	12.9542	4.8079	19.5941
56	7.88487			83	8.52952	36.4019	31.2187
57	8.39578	36.4676	39.5253	84	13.0094	2.6013	4.08872
58	4.91496			85	3.47338		
59	6.25945		2.43766	86	9.61957		
60	2.04	11.9417	27.1636	87	1.96643	0.28821	6.94583
61	17.1777		40.7584	88	5.637	2.70794	0.5154
62	7.8	17.7933	39.9143	89	20.2094	4.58052	
63				90	11.2625	2.67143	29.1255
64	36.3518	25.2221	35.2071	91	6.36661	2.75631	5.6373
65	1.75682			92	30.1481		2.97781
66	2.96169			93	6.37963	0.7656	3.83586
67	9.49747		10.6231	94	58.912	18.7255	17.4473
68	7.25673	12.9664	6.06667	95	5.89815		
69				96	26.2477	2.8563	12.1
70	8.79594	1.69833	3.8	97	57.4769	6.09349	8.0733
71	7.45364	4.07424	5.34634	98	65.9861	3.42447	10.7172
72	8.51985	5.8847	11.8668	99	34.2917	4.13453	2.70266
73	7.73657	10.2982	20.1024	100	4.31562	2.01026	4.36596
74	4.19172	5.82065	3.61077	101	44.4742	8.82134	6.81276
75			21.6392	102	4.03193	137216	3.13091
76				103	30.8125	13.8301	8.18437
77	3.82468		2.75104				
78	1.42662						
79	44.7647	10.8692	4.30794				

En esta tabla y en la figura que sigue se presentan las medias obtenidas mediante análisis densitométrico para los tres exones.

Tabla 8: Medias obtenidas por análisis

	Exón 2	Exón 3	Exón 4
Medias (D.O.)	18.7448	17.095	20.6003

Figura 22: Medias de las densidades ópticas de los tres exones.



11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la actualidad existen diversos estudios publicados acerca de los genes MICA y MICB en los cuales se investiga la posible relación entre estos genes y enfermedades comúnmente asociadas a los HLA, estos estudios han sido realizados en distintas poblaciones del mundo como lo son en caucásicos, asiáticos y algunas poblaciones de Latinoamérica, pero hasta el momento no existen estudios en población mexicana, es por estas razones que este trabajo es de gran relevancia porque sienta las bases para futuras investigaciones en las que se pretenda caracterizar los alelos de los genes MIC, sin olvidar también la relación de los alelos que se lleguen a encontrar, con enfermedades propias de la población mexicana.

En la figura 5 se muestra que los padres de los donantes en su mayoría provienen del Distrito Federal, Puebla y el Estado de México, de igual manera se observa en la figura 6 que las madres de los donantes son originarias del Distrito Federal, Veracruz y Estado de México.

Observamos en la figura 11 que la mayoría de los parientes provienen del Distrito Federal, Puebla, Estado de México, Veracruz, Hidalgo y Oaxaca demostrando de esta manera que la población que se selecciono para el estudio cumplía con el criterio de que fuera una población mestiza mexicana puesto que provienen de diversos estados del país. También en esta figura se pone en evidencia que más del 90 % de los familiares provienen del centro del país, el conocer este dato es muy importante porque de esta manera sabemos que el mestizaje de nuestra población es en particular del centro de la República, además en la actualidad no existen estudios en población mestiza mexicana en la que se investigue la presencia del gene MICA, específicamente que se analicen los exones más polimórficos de MICA y más importante aún la distribución de los distintos alelos presentes en la población mexicana.

En lo referente a los padecimientos presentados por los padres se observa en la figura 12 que del total tan solo 10 presentaron diabetes mellitus y solo uno presentó hipertensión, en contraste se observa en la figura 13 que las madres de los donantes presentaron mayor cantidad de enfermedades como fueron hipertensión (13 personas), diabetes mellitus (8 personas) al igual que cáncer y artritis, éstas diferencias en la cantidad de padecimientos presentados entre ellos pueden ser atribuidas a los ritmos de vida distintos que llevan.

Lo que se encontró en la figura 14 donde se muestran los padecimientos de los abuelos tanto paternos como maternos es que las enfermedades con mayor incidencia son la diabetes e hipertensión, seguidas del cáncer y la artritis. En la figura 15 se presentan los padecimientos de las abuelas, en donde también se observa una tendencia hacia la diabetes, hipertensión y cáncer, en contraste con las mamás de los donantes se observa un incremento en el porcentaje de mujeres que presentan algún tipo de padecimiento. Esta tendencia hacia dichas enfermedades es debida probablemente a factores como los hábitos alimenticios que tienen las personas en lo referente al abuso de algunos alimentos, además de que en algunos casos existe cierta tendencia hacia estos padecimientos debido a factores genéticos, y a que en los adultos mayores se presentan más las enfermedades degenerativas como las que presentaron abuelos y abuelas, esta información en conjunto pone de manifiesto que la población mestiza mexicana tiene alta tendencia a padecer en la tercera edad, diabetes así como también de padecer hipertensión o algún tipo de cáncer, incluso en algunos casos a padecer la combinación de estas tres enfermedades. En el caso de la diabetes en el INEGI se encuentra información disponible en donde se muestra que esta enfermedad se encuentra en el lugar número 11 como causa de muerte en hospitales en el periodo comprendido de 1998 a 2002.

La información anterior es de gran importancia para el estudio porque para el proyecto al cual pertenece la tesis, la obtención de los datos del tipo de padecimientos presentados por los familiares de los donantes permite conocer que

enfermedades se presentan con mayor frecuencia en la población mestiza mexicana de esta manera se obtiene información crucial para el seguimiento del trabajo, porque el siguiente paso es la caracterización de los alelos del gene MICA en dicha población lo que permitirá en un futuro estudiar si existe relación alguna entre enfermedades propias de la población mestiza mexicana y la incidencia de los alelos presentes, como ha sido demostrado en otras poblaciones.

En lo referente a las condiciones adecuadas para la amplificación de los exones del gene MICA se tuvieron que hacer diversos intentos modificando en cada caso cantidad de cloruro de magnesio, dNTP's, primers e inclusive en algunas ocasiones la cantidad de muestra de ADN a adicionar, después de casi dos meses de trabajo se logró obtener las cantidades óptimas de cada componente para que la reacción en cadena de la polimerasa fuera repetible y confiable. Dentro de todo este trabajo se determinó que la cantidad de cloruro de magnesio es crucial para el éxito del PCR debido a que si se adiciona en una cantidad distinta a la determinada se corre el riesgo de que los exones no se amplifiquen porque el ión magnesio actúa como cofactor de la enzima Taq y en el caso de que la cantidad de ión magnesio sea insuficiente la enzima no puede ser activada y no ejercer su función, en el caso contrario si se adiciona un exceso de magnesio este puede inhibir a la enzima dando como resultado de igual forma la nula amplificación. Así pues se encontró que la cantidad óptima de cloruro de magnesio es de 2 mM que se obtiene con 1.67 μ L de una solución 30 mM para un total de 25 μ L como se muestra en la tabla 4, para los dNTP's se determinó que con 0.2mM era suficiente para llevar a cabo la reacción, este parámetro es importante debido a que la enzima va acomodando los dNTP's para formar nuevas cadenas que en nuestro caso fueron los exones 2, 3 y 4.

En lo que respecta a la cantidad de primers adicionada se encontró que para el exón 2 sólo era necesario adicionar 3.75 pmol de cada primer por reacción, este dato es importante porque si adicionamos una cantidad menor de primer la reacción puede ser que no se lleve a cabo o el rendimiento de esta sea muy bajo

ya que estos primers son el detonante para que la reacción comience. En lo referente a la cantidad de enzima se determinó que con 0.75 unidades de Taq es suficiente para llevar a cabo la reacción, el haber determinado la cantidad mínima necesaria de enzima conlleva a una reducción de los costos de la reacción lo cual también es un factor muy importante a considerar para el desarrollo de esta técnica. Finalmente y no por eso menos importante la cantidad de ADN a adicionar fue de 10-100 ng esta cantidad se alcanzaba con 2.5 μ L de muestra original pero en algunos casos como se menciona más adelante fue necesario adicionar más volumen de muestra.

En el caso de los exones 3 y 4 la situación fue un poco distinta porque para estos exones se tuvo que incrementar la cantidad de cada primer a 12.5 pmol, también fue necesario hacer modificaciones en cuanto a la cantidad de muestra a adicionar, debido a que se observó que aún con las modificaciones hechas había todavía problemas para la amplificación de las muestras este cambio fue aumentar de 10 a 15 μ L la cantidad de muestra de ADN, esto fue hecho con la finalidad de alcanzar la cantidad de ADN de 10-100 ng.

La cantidad de amortiguador de reacción el cual viene en una presentación de 10x (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 10 μ g /mL) se determinó que era de 1x al adicionar 2.5 μ L, este parámetro se mantuvo constante para los tres exones. La cantidad de dNTPs que se utilizó fue de 0.2 mM que se conseguía adicionando 0.5 μ L de una solución 10 mM, esta cantidad fue la misma para los tres exones ya que demostró ser suficiente para llevar a cabo la reacción.

Cabe hacer notar que las condiciones ofrecidas por el laboratorio y las campanas de flujo laminar, así como también el empleo de sanitizantes fueron las adecuadas debido a que la reacción se pudo llevar a cabo de manera satisfactoria ya que no se presentó ningún problema de contaminación en las muestras, además de que se tuvo mucho cuidado en utilizar guantes limpios, áreas perfectamente desinfectadas, bata limpia, puntas y viales de trabajo nuevos y estériles, todo esto

contribuyó también en gran medida al éxito de la reacción como se mencionó anteriormente ninguna muestra presento problemas de contaminación. Esto fue corroborado con la utilización de un blanco que fue hecho cada vez que se realizaba la amplificación de las muestras, dicho blanco contenía lo mismo que las muestras a amplificar excepto del ADN, el volumen se completaba utilizando agua inyectable. En todos los casos sin excepción el blanco nos dio negativo lo cual indicaba que nunca existió contaminación alguna.

En lo que concierne a las condiciones de la electroforesis en gel de agarosa no existió problema puesto que para todas las muestras se manejaron los mismos tiempos y condiciones de voltaje descritos en la tabla 6 lográndose de esta forma distinguir perfectamente las bandas de los exones. El estandarizar estos parámetros para las muestras de los tres exones nos ayuda para tener la seguridad de los tiempos y voltajes utilizados, son los requeridos para obtener bandas perfectamente definidas las cuales nos permitirá realizar un análisis adecuado de la información.

Se presentan como ejemplos las figuras 16 y 17 que muestran las bandas obtenidas del exón 2 que fueron amplificadas el día 020204 y 091203 respectivamente, en donde se puede ver claramente que existe una amplificación satisfactoria de las muestras 10, 12, 17, 40, 49, 54, 74, 79, 81, 83, 1, 7, 11, 16, 21, 22, 23, 29, 35 que corresponden al día 2 de Febrero del 2004 y las muestras 71, 73, 79, 80, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 103, 104 correspondientes al día 9 de Diciembre del 2003, sin embargo en algunos casos se presentaron muestras que no amplificaron posiblemente debido a que el ADN estaba degradado.

La figura 18 corresponde al exón 3 y aquí también se observa que las muestras fueron amplificadas aunque en una menor proporción, debido muy posiblemente a que para este exón era necesario incrementar la cantidad de muestra en el PCR para lograr que las muestras que no amplificaron la primera vez lo hicieran

después, pero aún con esta modificación que se realizó algunas muestras siguieron sin amplificar, debido posiblemente a que el ADN se comenzaba a degradar. Por último en la figura 19 se presentan los amplificadores correspondientes al exón 4, aquí se ven las primeras 12 muestras las cuales siempre amplificaron para los tres exones de manera satisfactoria, esto puede deberse a que estas muestras se disolvieron con agua milliq estéril una vez que se les retiraba el alcohol y esto pudo ocasionar que se tuviera una mejor disolución del material genético. Las muestras siguientes que fueron de la número 14 en adelante se diluyeron en agua inyectable y no todas las muestras amplificaron satisfactoriamente, pero como se tenía el material genético por duplicado las contrapartes de las muestras se diluyeron con agua milliq estéril y se observó una mejoría en la amplificación puesto que muestras que no habían amplificado lo hicieron después con la variación hecha, este cambio en la disolución de la muestra es debido probablemente a que el agua milliq contiene la cantidad indicada de sales para favorecer la disolución del ADN, además esta calidad de agua es la recomendada para la realización de trabajos en biología molecular. Cabe comentar que las primeras 12 muestras solo estuvieron almacenadas en alcohol una semana, lo que podría ser un factor que influyera en la disolución.

En la figura 20 se presentan los porcentajes de los tres exones de las muestras que amplificaron, se observa que el exón 2 fue el que presentó una mayor cantidad de muestras amplificadas con un 95.14%, seguida del exón 4 con 75.7% y por último el exón 3 con 68.9%. También se realizó el análisis densitométrico de las bandas obtenidas con los tres exones, en la tabla 7 se observan las medias de la densidad óptica (DO) de los tres exones y se aprecia que existen diferencias del valor entre muestras, la medida de este parámetro nos indica la concentración del exón amplificado expresado en DO debido a que una banda bien definida nos reporta un valor más elevado que una banda más tenue, esto es posiblemente debido a que se tuvieron problemas con la concentración de la muestra de ADN, es decir, no se alcanzaba la cantidad de 10-100 ng necesaria para obtener una buena amplificación pero aún así se obtuvo un buen porcentaje de muestras

amplificadas, sin embargo la media de la densidad óptica para el exón 2 dio un valor de 18.7448 quedando por debajo del valor encontrado para el exón 4. En el caso del exón 3 la cantidad de muestras amplificadas fue menor y la media de la densidad óptica también fue menor que en los otros dos exones dando un valor de 17.095, por último el exón 4 fue el que presentó la media más alta con un valor de 20.6003 y este exón además presentó una mayor cantidad de muestras amplificadas que el exón 3.

Estas diferencias en el valor de la densidad óptica nos refleja que el exón 4 del gene MICA presentó una mejor amplificación que la obtenida para los otros dos exones, esto posiblemente se deba que para el exón 4 se utilizó una mayor cantidad de muestra, esto fue debido a que la experiencia con los dos exones anteriores nos indicaba que incrementando la cantidad de muestra a adicionar en el PCR nos daba mejores resultados debido a que de esta manera llegábamos a la cantidad de 10-100 ng. Con respecto a la nula amplificación de algunas muestras se puede inferir que la cantidad adicionada de ADN no fue la suficiente como para lograr que se obtuviera el amplificado o que el ADN se estuviera degradando. En lo referente a los exones 3 y 4 que presentaron menor cantidad de muestras amplificadas puede deberse a que para esos exones en particular se necesitará una mayor cantidad de muestra que optimizará la amplificación. En el caso particular del exón 3 el cual presentó el menor número de muestras amplificadas, puede ser debido éste bajo porcentaje también a la presencia de un splicing en este exón puesto que existe un precedente en un estudio realizado en una población de Paraguay en donde se observó que el exón 3 no siempre se expresaba en la población de estudio.

12. CONCLUSIONES

Se obtuvieron satisfactoriamente 103 muestras de DNA de una población mestiza mexicana.

En lo referente a la selección de la población de estudio es claro que es principalmente de la zona centro del país.

Los padecimientos que los familiares de los donantes presentaron con mayor frecuencia fueron la diabetes mellitus, hipertensión, artritis y diferentes tipos de cáncer, esto fue con mayor incidencia en la edad adulta mayor.

Se lograron establecer las condiciones adecuadas para la amplificación de los exones 2, 3 y 4, aunque no se logró que amplificaran el 100 % de las muestras.

La densidad óptica fue mayor para el exón 4 debido a que la experiencia anterior con los exones 2 y 3 nos indicó que para tener mejores resultados había que incrementar la cantidad de muestra a adicionar para poder alcanzar la cantidad de 10-100 ng.

13. SUGERENCIAS

Al realizar la extracción de ADN disolver inmediatamente el material genético en agua milliq estéril.

Almacenar en congelación a 20° C bajo cero.

Emplear para la preparación de disoluciones y soluciones agua milliq estéril.

También sería recomendable que para facilitar la disolución del ADN incubar a 55° C durante dos horas.

Para evitar la contaminación de las muestras de ADN obtenidas sería conveniente trabajar con alícuotas de las muestras originales.

14. ANEXO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución hipotónica:

1. Pesar 3.63 g de Tris y 5.58 g de EDTA y disolver en 1.5 litros de agua destilada.
2. Ajustar el pH a 8 con solución de NaOH saturada o HCL concentrado según sea necesario.
3. Una vez ajustado el pH a esterilizar en la autoclave colocando un tapón de papel aluminio y cinta indicadora de esterilidad.
4. Una vez estéril la solución se deja enfriar a temperatura ambiente dentro de la campana.
5. Guardar la solución a 4°C bien cerrada.

Solución salina:

1. Pesar 9 g de cloruro de sodio grado reactivo y disolver en 1 litro de agua destilada.
2. Colocar tapón de papel aluminio y cinta indicadora de esterilidad al recipiente y esterilizar.
3. Una vez estéril la solución dejar enfriar a temperatura ambiente dentro de una campana.

Solución TBE 10X:

1. Pesar en una balanza semianalítica 121.10 g de Tris, 61.83 g de ácido bórico y 14.61 g de EDTA.
2. Disolver en un matraz volumétrico de 1 litro el EDTA en 500 mL de agua milliq, una vez disuelto continuar con el Tris y por último con el ácido bórico.
3. Adicionar agua milliq hasta la marca de aforo, homogenizar invirtiendo el matraz en repetidas ocasiones.
4. Guardar a temperatura ambiente.

REALIZACIÓN DE DILUCIONES

dNTP's:

1. De la solución 100 mM realizar una dilución 1 a 10 con agua milliq para obtener una solución 10 mM.
2. Para alcanzar la concentración de 0.2 mM tomar 0.5 μ L de la solución anterior por cada reacción.

Primer's:

1. Disolver el contenido de cada vial con 1 mL de agua inyectable, para el caso primer del exón 3 5' se obtiene una solución 81.64 pmol/ μ L.

2. Tomar 30 μL de la solución anterior y adicionar agua inyectable hasta 100 μL , se obtiene una solución 25 $\text{pmol}/\mu\text{L}$.

3. Realizar lo mismo con los demás primer's tomando en cuenta la cantidad de materia que contiene cada vial.

Marcador de pesos moleculares:

1. Tomar 10 μL del vial y realizar una dilución 1 a 6 utilizando agua inyectable.

2. Almacenar en congelación a 20°C bajo cero.

15. GLOSARIO

Alelo: Cada variante común de un gene polimórfico presente en una población se llama alelo.

Alogénicas: Cepas diferentes pueden expresar alelos distintos y se dice que son alogénicas entre sí.

Amplificación: Incremento del número de copias de una secuencia específica de ADN in vitro por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

BAT: Gene que codifica proteína que participa en diferentes funciones celulares como la iniciación de la traducción, espermatogénesis, ovogénesis, división y crecimiento celular.

Células NK (Natural Killer): Forman parte de la inmunidad natural y median reacciones de citotoxicidad.

Células T CD4⁺: Reconocen antígenos extraños unidos a las moléculas de clase II.

Células T CD8⁺: Reconocen antígenos extraños unidos a las moléculas de clase I.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

Exón: Región de un gene que codifica una porción de su proteína correspondiente; los exones están separados por regiones no codificantes de ADN conocidas como intrones.

Haplotipo: A causa de un eslabonamiento íntimo, la combinación de alelos en un solo cromosoma se hereda por lo general, como una unidad. Esta unidad se conoce como el haplotipo.

HLA: Antígenos humanos leucocitarios (HLA del inglés, human leukocyte antigens)

Intrón: Región de gene no codificante que separa a los exones entre sí.

Kilobase: Unidad de longitud en las cadenas de ADN equivalente a 1000 pares de bases.

Locus: Posición en el cromosoma donde puede localizarse un determinado gene.

MICA: Gene perteneciente a la familia MIC que se encuentra relacionado con al HLA-B de clase I.

Polimorfismo: Variación en la secuencia de ADN de un alelo determinado en una población determinada.

PCR (Polimerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa.

Primer's: Son fragmentos de un gene que en el proceso de PCR inician la amplificación del gene de interés.

Singénico: Genéticamente idéntico.

SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probe): Prueba de secuenciación específica de oligonucleotidos.

Splicing: Diferentes maneras de combinar los exones de un gene para dar lugar a variantes de la proteína codificada.

TBE: Solución que contiene tris, ácido bórico y EDTA.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

16. REFERENCIAS

1. Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. 2002. Inmunología Celular y molecular. 4^a Ed. McGraw-Hill Interamericana.
2. Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K, Miyata Y, Wakisaka K, Bahram S, Inoko H. Allelic variants of the human MHC class I chain –related B gene (MICB). *Immunogenetics* 1997; 46: 499-508.
3. Bahram S, Siina T, Oka A, Tamiya G, Inoko H. Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Immunogenetics* 1996 August 7; 45: 161-162.
4. Barham S, Mizuki N, Inoko H and Spies T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996a; 44: 80-1.
5. Bolognesi E, Alfonso D, Rolando V, Fasano M, Pratico L, Momigliano-Richiardi P. MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. *European Journal of immunogenetics*. 2001. 28, 523-530.
6. Claus R, Bittort T, Walzel H, Brock J, Uhde R, Meisk D, Schulz U, Hobusch K, Schumacher M, Bartel F, Hausmann S. High Concentration of Soluble HLA-DR in the Sinovial fluid: Generation and Significance in “Rheumatoid-like” Inflammatory Joint Diseases. *Cellular Immunology* 2000; 206: 85-100
7. Collins R. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *European Journal Immunogenetics* 2004 April 15; 31:105-114.
8. Dawkins R. Haemochromatosis, Psoriasis Vulgaris and Other Diseases Associated with HLA Class I Alleles. International Histocompatibility Working Group. International Histocompatibility Working Group 2000

9. Fischer G, Argüello R, Pérez M, McWhinnie A, Marsh S, Travers P, Madrigal. Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics* 2000 January 20; 51: 591-599.
10. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Barham S. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996; 44: 351-357.
11. Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S. MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 1999; 49: 557-560.
12. Gambelunghe G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi C. Microsatellite Polymorphism on the MHC Class I Chain-Related (MIC-A and MIC-B) Genes Marks the Risk for Autoimmune Addison' Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 10: 3701-3707.
13. Gambelunghe G, Hhaderi M, Tortoioli C, Falorni A, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi C, Falorni A. Two Distinct MICA Gene Markers Discriminate Major Autoimmune Diabetes Types. *The Journal of Endocrinology and Metabolism* 2001; 8: 3754-3760.
14. Gaudieri S, Kulski J, Dawkins R, Gojobori T. Different Evolutionary Histories in Two Subgenomic Regios of the Major Histocompatibility Complex. *Issue June* 1999; 6: 541-549.
15. Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J; Cosman D and Dawkins RL. 1997a. Allelic and interlocus comparision of the PERB11 multigene family in the MHC. *Immunogenetics*. 45:209-16.

16. González S, Rodríguez S, Martínez J, López A, Rodrigo L, López C. MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers. *Immunogenetics*. 2002 October 9; 54: 850-855.
17. Gruen J, Weissman S. Evolving Views of the Major Histocompatibility Complex. *Blood* 1997 December 01; 11: 4252-4265.
18. Kayano A, Russomando G, Kikuchi M, Andia N, Franco L, Almiron M, Ubalee R, Hirayama K. High frequency of MIC null haplotype (HLA-B48-MICA-del-MICB* 0107 N) in the Angaité Amerindian community in Paraguay. *Immunogenetics* 2002 April 11; 54: 439-441.
19. Leelayuwat Ch, Townend D, Degli-Esposti M, Abraham L, Dawkins R. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics* 1994 July; 40: 339-351.
20. Leelayuwat Ch, Pinelli M, Dawkins R. Clustering of Diverse Replicate Sequences in the MHC. *The Journal of Immunology* 1995; 155: 692-698.
21. Lewin B. 2001. *Genes VII*. 7^a Ed. Marban Libros, S.A.
22. Li P, Willie S, Bauer S, Morris D, Spies T, Strong R. Crystal structure of the MHC Class I homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T cell ligand. *Immunity*. 1999 May; 10: 577-584.
23. Marín M, Savioli C, Yamamoto J, Kalil J, Goldberg A. Mica polymorphism in a sample of the Sao Paulo population, Brazil. *European Journal of Immunogenetics* 2004 January 20; 31: 63-71.

24. Margni Ricardo Anibal. 1996. Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. 5^a Ed. Editorial Médica Panamericana.
25. Mendoza J, Partida O, Soto I, Rangel R, Corona T, García A, Weiss B. Los genes MIC (MHC class I chain related genes): su importancia en la respuesta inmune no específica y en condiciones patológicas. *Vertientes*. 2002 Enero 8; 4(1-2): 7-12.
26. Mendoza J, Arguello JR, Pérez M, McWhinnie A, Marsh SG, Fischer G, Madrigal JA. Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing. *Immunogenetics* 1998 September 16; 49: 471-471.
27. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsumaya Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997 February; 94: 1298-1303.
28. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Sambrook Joseph. 2a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Impreso en USA. 1989
29. Pardo Mindan E.J. 1999. *Anatomía Patológica General* vol. 1. España. Ediciones Doyma.
30. Park Y, Lee H, Sanjeevi C, Eisenbarth G. MICA Polymorphism Is Associated With Type 1 Diabetes in the Korean Population. *Diabetes Care* 2001; 24: 33-38.
31. Pellet P, Renaud M, Fodil N, Laloux L, Debré Patrice, Bahram S, Theodorou I. Allelic repertoire of the human MICB gene. *Immunogenetics* 1997; 46: 434-446.

32. Petersdorf E, Shuler K, Longton G, Spies T, Hansen J. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 1999 August 5 ; 49: 605-612.
33. Picco P, Porfirio B, Gattorno M, Buoncompagni A, Falcini F, Cusano R, Bordo D, Pistola V, Ravazzolo R, Seri M. MICA gene polymorphism in a Italian paediatric series of juvenile Behcet disease. *International journal molecular medicine*. 2002 April 16; 10: 575-578.
34. Steinle A, Groh V, Spies T. Diversification, expression , and $\gamma\delta$ T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Immunology* 1998; 95: 12510-12515.
35. Stephens H. MHC haplotypes, MICA genes and the 'wonderland' of NK receptor polymorphism. *Trends in immunology* August 2002; 8: 385-386.
36. Stephens H. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends in immunology* July 2001; 7: 378.
37. Stites DP. 2002. *Inmunología básica y clínica*. 10^a Ed. Editorial el manual moderno S.A. de C.V.
38. Tamarín RH. 1996. *Principios de Genética*. Editorial Reverté, S.A.
39. Tian W, Boggs D, Ding W, Chan D, Fraser P. MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 20 African-American Families. *Immunogenetics* 2001; 53: 724-728.
40. Vargas G, Gamboa R, Zúñiga J, Hernández G, Ramos M, Castillo E, Gómez E, Martínez J, Arnaiz A, Granados J. HLA-DR4 Allele Frequencies on Indian and

Mestizo Population from México. Human Immunology 1999 December 1; 61: 341-344.

41. Vargas G, Gamboa R, Vergara Y, Rodríguez J, De la Peña A, Izaguirre R, Zúñiga J, Ruiz J, Granados J. LMP2 and LMP7 gene polymorphism in Mexican populations: Mestizos and Amerindians. Genes and immunity 2002; 3: 373-377.

42. Visser C, Tilanus M, Tatari Z, Van der Zwan A, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D. Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage classical HLA genes. Immunogenetics 1998 October 27; 49:561-566.

43. Voet D, Voet J. 1996. Bioquímica. 1ª ed. Barcelona. Ediciones Omega.

44. Wallace G, Verity D, Delamaine L, Ohno S, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Yabuki K, Kondiatis E, Stephens H, Madanat W, Kanawati C, Stanford M, Vaughan R. MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behcet disease. Immunogenetics 1999 January 26; 49: 613-617.

45. www.inegi.gob.mx

46. Yabuki K, Mizuki N, Ota, M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kaklamani E, Inoko H, Ohno S. Association of MICA Gene and HLA-B*5101 with Behcet's Disease in Greece. Investigative Ophthalmology and Visual Science 1999; 40: 1921-1926.

47. Zhang Y, Lazaro A, Lavingia B, Stastny P. Typing for All Known MICA Alleles by Group-Specific PCR and SSOP. Human Immunology 2001 March 2; 62: 620-631.

48. Zhang Y, Lazaro A, Zou Y, Lavingia B, Moraes M, Moraes J, Stasny P. MICA polymorphism in South American Indians. *Immunogenetics* 2002 February 1; 53: 900-906.

49. Zou Y, Stasny P. Alternatively spliced forms of MICA and MICB lacking exon 3 in a human cell line and evidence of presence of similar human peripheral blood mononuclear cells. *Immunogenetics* 2002 October 25; 54: 671-674.

50. Zwirner N, Fernández M, Stasny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 1998; 47: 139-148.