UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARACTERIZACIÓN DE GENES *KIR* EN NAHUAS MEDIANTE PCR-SSP Y SU COMPARACIÓN CON MESTIZOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ ESTEBAN MUÑOZ MEDINA

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Margarita Gutiérrez Rodríguez .

ASESOR DE TESIS: Dr. Rubén Marroquín Segura .

2007

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	25
DISEÑO DE INVESTIGACION	26
MATERIAL	27
METODOS	29
DIAGRAMA DE FLUJO	31
RESULTADOS	32
ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
CONCLUSIONES	43
ANEXOS	44
REFERECIAS	45

RESUMEN

Las células NK son linfocitos que circulan por el torrente sanguíneo. En cuanto a su superficie celular y a los mecanismos citolíticos, las células NK son similares a las T especialmente a las $CD8^+$ aunque a diferencia de las células T y B, las NK no tienen un receptor clonal simple para los antígenos, que defina el linaje celular, en la práctica se define a las células NK como linfocito que posee receptores CD56 pero no CD3.

Las células NK expresan una gran cantidad de receptores de superficie, estructuralmente la mayoría de los receptores de las células NK son del tipo de las inmunoglobulinas (KIR).

Además del tipo Ig los receptores de las células NK pueden dividirse en dos grupos, de acuerdo a la traducción intracelular de señales de inhibición o activación. La integración de estas señales determina la respuesta de la célula, implicando competición y balance entre ellas.

Si bien las células NK expresan muchos tipos diferentes de receptores particularmente no los expresan todos y solo pocos receptores son expresados por todas las células NK. A esto se le considera como heterogeneidad propia de la población celular.

Los genes KIR son codificados por genes situados en el cromosoma 19q13.4 y expresados en todas las células NK, y en subpoblaciones de células T de memoria, y casi todas las células T $CD8^+$.

Con la caracterización de *KIR´s* en poblaciones de Asia, Australia y familias Caucásicas, se han identificado más de 100 genotipos diferentes.

Con el fin de conocer la distribución de estos genotipos en la población mexicana es que nos planteamos como objetivo identificar genotipos de *KIR* en un grupo étnico (nahua) y compararlo con mestizos.

Para ello recolectamos muestras de sangre a 58 individuos del grupo étnico nahua (padres y abuelos nacidos en la misma población) de las cuales se aisló el ADN por la técnica de columnas de Quiagen, se leyó su concentración por espectrofotometría y se ajustó a 25ng/μL. Se realizó la amplificación de la región de ADN correspondiente mediante la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos (PCR-SSP) seguido de una electroforesis con marcadores de peso de 50 y 100 pares de bases (pb) para determinar el peso de las bandas obtenidas. Se sumergió en una solución de bromuro de etidio para revelarlo y se visualizó en un transiluminador bajo luz UV.

Se identificaron 14 genes *KIR*, 8 inhibidores (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2 y 3DL3) y 6 activadores (2DS1, 2DS2, SDS3, 2DS4, 2DS5 y 3DS1), con los que se determinó el genotipo y se le asignó un número de acuerdo a lo reportado por Makoto Yawata, obteniendo en mayor proporción el genotipo 1 para mestizos y nahuas.

Una vez conociendo la proporción de genotipos *KIR* en poblaciones mexicanas podemos indagar acerca de posibles implicaciones con ciertos padecimientos o predisposición a ellos.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es capaz de ejercer su acción protectora por medio de diferentes mecanismos, los cuales además de incluir barreras naturales de protección como la piel, mucosas, sistema de complemento, etc., se incluye a las células de la inmunidad innata. De ésta, las células NK o linfocitos asesinos naturales (de sus siglas en ingles Natural Killer) son las células centrales de los mecanismos innatos de defensa.

La actividad citotóxica de las células NK está regulada por receptores presentes en su membrana. Se han identificado dos familias de receptores: los receptores KIR, estructuralmente relacionados con inmunoglobulinas (*killer cell immunoglubulin like receptors)* y los receptores tipo lecitina, también llamados NCR *(natural cytotoxicity receptors)*. Los receptores pueden ser activadores o inhibidores; los receptores activadores proporcionan el estimulo requerido para la producción de citocinas y su actividad citotóxica y poseen regiones ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) mientras que los receptores inhibidores son los encargados de aumentar, limitar o terminar la respuesta y poseen secuencias ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*).

Los receptores KIR están codificados por una familia de 14 genes, de los cuales 6 son activadores (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 y 3DS1) y 8 inhibidores (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2 y 3DL3) provenientes de un polimorfismo poligénico agrupados en una región de 150Kb (kilo bases ó miles de bases) aproximadamente. Este locus se localiza en el cromosoma 19q13.4 dentro del sistema receptor leucocitario (LCR) 1Mb (mega base ó millón de bases). Los genes están organizados de una forma en que cada gen tiene

una extensión aproximadamente de 10-16Kb con una secuencia que separa cada par de genes de alrededor de 2Kb, excepto por una extensión de 14Kb correspondiente a una secuencia única para el gen 2DL4.

Este polimorfismo no ha sido estudiado en poblaciones de México mientras que en poblaciones de Asia, África, Australia y en familias caucásicas, (entre otras), se han identificado entre 7 y 14 genes y se ha detectado un número variable de estos genes en cada individuo.

Tomando en cuenta que los grupos étnicos de nuestro país son grupos sociales altamente arraigados a sus costumbres y tradiciones y que hasta nuestros tiempos aún existen regiones en las cuales estos grupos de personas no han estado expuestas al entrecruzamiento racial, se espera encontrar diferencias en las frecuencias genéticas de éstos con respecto a los mestizos.

Al mismo tiempo la descripción de la diversidad del complejo de genes *KIR* y el desarrollo de sistemas eficientes de tipificación, seguramente fomentarán estudios de asociación-susceptibilidad a enfermedades y ayudará al entendimiento de la función biológica y el equilibrio entre el ajuste de receptores inhibidores y activadores de células NK que se encuentran en tumores y varias infecciones virales.

MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES.

La humanidad siempre ha sido afectada por enfermedades que en forma de epidemias han eliminado a comunidades enteras. En el pasado, las enfermedades y las epidemias eran consideradas como maleficios o como castigos divinos. Ésta idea fue enérgicamente rechazada por Hipócrates, el famoso médico griego nacido en el año 460 a.C., quien sostuvo que las enfermedades eran ocasionadas por factores tales como el clima (el frío, el calor o los vientos), el agua, la tierra, la comida y los hábitos de vida de los individuos. Se sabía que algunas enfermedades podían transmitirse de una persona a otra cuando vivían en estrecha proximidad o cuando hacían uso indiscriminado de utensilios o ropa de uso personal. Ahora sabemos que también existen factores de tipo genético que predisponen a un individuo o a un grupo de individuos que podría incluso llegar a ser toda una población (aislada) a desarrollar ciertas enfermedades y que éstas características se hereden de padres a hijos.

A. Factores genéticos y raciales.

Algunas especies de animales son naturalmente resistentes a la infección por ciertos microorganismos, otras son altamente susceptibles: se sabe que los humanos y los cobayos son especies altamente susceptibles a la difteria, mientras que la rata es una especie resistente. De igual manera se ha visto que los humanos y los armadillos de nueve bandas son susceptibles a la lepra y que los ratones y la mayoría de otras especies son resistentes a la enfermedad.

También y a manera de anécdota, se consideró que los indios americanos y los individuos de raza negra eran genéticamente más susceptibles a la tuberculosis que los anglosajones de raza blanca. Ocurría que aun cuando todos los individuos llegaban a enfermar, en los blancos la enfermedad era localizada y autolimitada, en tanto que en los negros la enfermedad era diseminada y tenía un mayor índice de mortalidad.

Más convincentes fueron los estudios con gemelos, que indicaron que, cuando en una familia había un hijo con tuberculosis, la posibilidad de contagio era del 87% entre los gemelos idénticos (univitelinos), del 26% entre los gemelos no idénticos (heterocigotos) y del 26% entre los hermanos no gemelos. Asimismo, la posibilidad de que cualquiera de los padres enfermase de tuberculosis fue tan solo del 7%[1].

B. Genética Poblacional.

Los biólogos emplean el término población para definir aquellos grupos que se adaptan de manera similar. Los especialistas en genética de las poblaciones limitan más la acepción y describen grupos de formas sexuadas que se agrupan para reproducirse y por motivos ecológicos. Genéticamente definida, una población (o mejor, una población genética) es un grupo espacial y temporal de individuos conespecíficos que se reproducen por intracruzamiento. La población genética tiene continuidad a través del tiempo por la interconexión reproductiva entre las generaciones y tiene unidad espacial por el cruzamiento entre sus miembros. Una población puede aumentar o disminuir de tamaño por la migración de individuos hacia adentro o hacia afuera, o por la diferencia en el

número de nacimientos y muertes. Pueden fundirse con otras poblaciones o extinguirse por la muerte o la migración de todos sus miembros.

Vista así la población, el intercambio de genes entre sus miembros es la consideración principal. En realidad, se logran muchos descubrimientos en la genética de las poblaciones considerándolas más como poblaciones de genes que de individuos. De este modo, toda la información genética que se encuentra entre un grupo de individuos que se mezclan y reproducen forma un *caudal genético*, que se dispersa temporalmente y se conserva como conjunto de genotipos particulares. Los zigotos (genotipos) que se transforman en individuos de una generación provienen de la unión de gametos producidos por la generación anterior. Los alelos son seleccionados, barajados, y finalmente combinados en gametos por el proceso de la meiosis. Los gametos, a su vez, se combinan durante la fecundación y producen un nuevo conjunto de genotipos. En consecuencia, cada generación reconstituye el caudal de genes.

El concepto del caudal o acervo genético se manifiesta mejor en las colonias pequeñas aisladas parcial o totalmente, cuyos miembros se mezclan y reproducen de modo cercano a la panmixia, o sea que el acoplamiento de pares es una asociación casual de genotipos[2].

C. Poblaciones Humanas.

La especie humana con cerca de 5 000 millones de miembros, se subdivide en muchas subpoblaciones distinguibles, las más grandes se denominan comúnmente razas. Éstas se definen como grupos de poblaciones principales cuyos acervos genéticos difieren entre si. Existen tres divisiones raciales principales: caucásicos, negros y asiáticos, cada una de las cuales tiene numerosos subgrupos genéticamente diferentes. Aunque los cromosomas humanos y los loci que contienen son idénticos en todos los miembros de la especie, las frecuencias alélicas en muchos loci varían ampliamente entre grupos poblacionales.

En el periodo glacial más reciente, hace 10 000 años aproximadamente, la masa terrestre euroasiática, en la que se habían desarrollado asentamientos humanos pequeños y esparcidos, se dividió en tres regiones distintas separadas por áreas glaciales montañosas que constituyeron barreras físicas para la comunicación y el apareamiento. Se cree que en éstas regiones geográficas genéticamente aisladas unas de otras, se desarrollaron los tres grupos raciales principales. Después cada grupo se subdividió cada vez más en numerosas subpoblaciones distintas, a menudo denominadas grupos étnicos, con sus propios conjuntos característicos de frecuencias genéticas[3].

D. Nahuas

El nombre del grupo nahua proviene del verbo nahuatli (hablar con claridad); este término se emplea para designar tanto al grupo como al lenguaje de los mexicas. El grupo nahua es el más numeroso de México, sus miembros viven en diferentes estados del país: en Puebla, Veracruz, Hidalgo, San Luis Potosí, Tlaxcala, Morelos, Estado de México, Distrito Federal con 83 064, y Guerrero con 128 192 habitantes. En menor proporción se localiza en Oaxaca, Jalisco y Michoacán[4].

La lengua náhuatl se localiza dentro de la subfamilia “aztecoide” que pertenece a la familia o grupo yuto-azteca. Este grupo de lenguas emparentadas se habla desde las mesetas de la Gran Cuenca del Oeste de los Estados Unidos hasta algunas regiones de Nicaragua. Dentro del territorio mexicano el náhuatl es el idioma con mayor número de hablantes del grupo yuto-azteca. Según sus características lingüísticas, el náhuatl se ha dividido en cuatro grupos: el del este, del oeste, el central y el septentrional, el de Morelos pertenece al segundo que utiliza la “tl” al final.

Los Nahuas de Morelos ya sea que hablen su lengua o no, conservan en gran medida sus costumbres y tradiciones. Su visión del mundo, de la naturaleza, de Dios, sus procesiones a lugares sagrados, su danza, su música y en gran medida solo se unen con miembros de su misma población[5].

2. TIPOS DE INMUNIDAD.

A. Natural.

Los animales tienen barreras y sustancias naturales que ayudan a evitar las infecciones por microorganismos y parásitos. La piel y las secreciones mucosas actúan como barreras y las enzimas proteolíticas (enzimas digestivas que escinden las proteínas) presentes en los líquidos orgánicos destruyen algunos organismos invasores. La inmunidad natural es relativamente inespecífica, aunque casi siempre discrimina con claridad entre lo propio y lo ajeno. Reacciona rápidamente y constituye una primera línea de defensa contra la invasión no deseada y la infección[1].

B. Adquirida.

La capacidad para responder específicamente frente a lo ajeno se adquiere por interacción con los antígenos (sustancias extrañas potencialmente peligrosas para el organismo) presentes en tales organismos.

La inmunidad adquirida se basa en la actividad de dos sistemas: humoral y de mediación celular. La inmunidad humoral está mediada por proteínas solubles llamadas inmunoglobulinas o anticuerpos. Los mamíferos producen cinco clases diferentes de moléculas de inmunoglobulina llamadas G, M, A, D y E. Partes de la estructura de estas moléculas proteicas globulares relativamente grandes consisten en secuencias cortas situadas muy cerca de la superficie de

la molécula que interaccionan específicamente con el antígeno. Otras partes de las moléculas de anticuerpo actúan como intermediarias en funciones inmunológicas como la interacción de activación del complemento con macrófagos y otras células.

Los anticuerpos se enlazan específicamente con organismos y sustancias ajenos. Esto determina con frecuencia la inactivación de propiedades indeseables. Los complejos antígeno-anticuerpo se eliminan del cuerpo mediante diversos procesos y los microorganismos recubiertos de anticuerpos son particularmente sensibles a la fagocitosis por parte de los macrófagos y otras células. Después de interaccionar con un antígeno, los anticuerpos activan una gama de mecanismos inmunobiológicos que protegen frente a las infecciones y otros efectos indeseables[6].

La inmunidad celular inicia cuando las células presentadoras de antígeno (CPA) capturan microorganismos o antígenos extraños y los procesan; los péptidos antigénicos resultantes, o epitopos, se asocian con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II para presentarse en la membrana celular y reaccionar con linfocitos Th1 ($CD4^+$) al mismo tiempo que libera las citocinas IL-1, IL-6 e IL-12. Estas citocinas estimulan, en los linfocitos T la síntesis de IL-2 (factor de proliferación de células T y B) y de su receptor IL-2R. Los linfocitos estimulados proliferan varias veces hasta formar una clona y mientras proliferan producen y liberan las citocinas interleucina 2 (IL-2), interferón γ (IFNγ) y factor de necrosis tumoral β (TNFβ).

Algunas de las células que proliferan tienen propiedades citotóxicas. Cuando están activadas, estas células son capaces de matar tanto a células portadoras de antígenos extraños (células tumorales y células de transplante) como a células parasitadas por microorganismos intracelulares. La muerte de células blanco ocurre cuando menos a través de dos mecanismos generales: por necrosis o por apoptosis[1].

1. Necrosis.

En la necrosis la célula citotóxica “inyecta” en la célula blanco el contenido de sus gránulos que incluye perforinas, granzimas y enzimas hidrolíticas, además de los radicales libres de oxigeno y el nitrógeno neoformados. Estos y otros factores externos lesionan indiscriminadamente a las células y ocasionan la ruptura de sus membranas, organelos y moléculas estructurales.

Algunos de los factores de muerte por necrosis son también inductores de apoptosis: dentro de estos factores están las granzimas, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico.

2. Apoptosis.

La apoptosis es un proceso de muerte más sutil que se induce por señales químicas derivadas del contacto con otras células o substancias producidas por ellas. Mientras que la mayoría de las células, incluyendo las tumorales expresan en su membrana la molécula Fas (CD95), las células

citotóxicas expresan el ligando de Fas (CD95L). La interacción Fas-FasL causa la muerte de las células portadoras de Fas por activación del sistema de las caspasas. Las caspasas son enzimas dependientes de cisteína que escinden a otras caspasas en secuencias del extremo C-terminal que contienen residuos de aspártico y que de esta manera resultan activadas.

El sistema de las caspasas inicia con la interacción Fas-FasL la cual induce señales que se transducen al citoplasma de la célula blanco y que finalmente inciden en las mitocondrias, lesionándolas. Las mitocondrias lesionadas dejan escapar citocromo C y este interactúa con el factor promotor de la apoptosis Apaf-1 y lo oligomeriza. El Apaf-1 oligomerizado activa a las pro-caspasas 8 y 9, y estas a su vez activan a la pro-caspasa 3. La pro-caspasa 3 interacciona con la membrana mitocondrial, promoviendo la liberación adicional de citocromo C y amplificando las señales de apoptosis. La caspasa 3 activa también a otras caspasas, algunas de estas caspasas actuan como nucleasas en tanto que otras activan a otras nucleasas. Finalmente las caspasas con actividad de nucleasa y las nucleasas fragmentan el DNA iniciando los cambios morfologicos que caracterizan a las células apoptóticas[1].

3. CÉLULAS NK DE LA INMUNIDAD INNATA.

La inmunidad innata se encuentra presente en todos los seres vivos y antecede a la inmunidad adquirida, ya que no requiere de una exposición previa con el patógeno para su activación y sus mecanismos de reconocimiento se activan inmediatamente después de la infección. Por este motivo no tiene memoria inmunológica, no se modifica a lo largo de la vida del individuo y juega un papel importante en el proceso de inflamación.

El sistema inmune es capaz de ejercer su acción protectora por medio de diferentes mecanismos, los cuales además de incluir barreras naturales de protección como la piel, mucosas, sistema de complemento, etc., se incluye a las células de la inmunidad innata (células fagocíticas, células NK, etc.). De éstas, las células NK o linfocitos asesinos naturales (de sus siglas en inglés Natural Killer) son las células centrales de los mecanismos innatos de defensa[7].

Las células NK son un subgrupo de linfocitos que se encuentran en la sangre y los tejidos linfoides, especialmente en el bazo, constituyen del 5 al 16% del total de los linfocitos de la población sanguínea. Estas células derivan de la medula ósea y parecen linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos, por lo que a veces se les llama linfocitos granulares grandes. Las células NK son una primera línea de defensa importante contra la aparición de células malignas y células infectadas por virus, bacterias y protozoarios[8].

Debido a que no hay una manera clara de definir a las células NK se les conoce como linfocitos T citotóxicos (LTC) filogenéticamente primitivos, que

carecen de receptor de células T (TCR) específicos para el reconocimiento del antígeno. Las células NK poseen la capacidad de matar a ciertas células tumorales y normales infectadas por virus. La lisis que realizan las células NK no es específica para determinantes antigénicos virales particulares. Tal lisis es "natural" en el sentido que no es inducida por antígenos específicos, por lo que es parte de la inmunidad natural y no de la específica. Aunque la especificidad de objetivos de las células NK es menos amplia que la de los LTC, no es aleatoria, las células NK pueden lisar células normales infectadas por algunos virus, pero no por otros, y no lisarán células no infectadas. La lisis generada por las células NK implica mecanismos similares a los utilizados por los LTC, sobre todo la exocitosis de gránulos, la inducción de la fragmentación de ADN, y la apoptosis. Los gránulos de las células NK, como de los LTC, contienen perforinas, citotoxinas, estereasa serina y proteoglicanos[7].

Las células NK no maduran en el timo ya que están presentes en animales sin timo, además no expresan moléculas CD3; sin embargo, si expresan la molécula CD2.

Las células NK circulan en un estado de "listas para actuar", lo cual las capacita para entrar y defender un tejido tan pronto como éste llegara a estar dañado o infectado, produciendo citocinas como IFN γ (interferón gama) o TNFα (factor de necrosis tumoral alfa) entre otras, lo cual le permite activar otros mecanismos de inmunidad tanto innata como adquirida si se requiriera, causando toxicidad directa. De este modo, las células NK funcionan como puente entre los sistemas inmunitarios innato y adquirido al actuar como una línea de defensa frontal mientras se producen citocinas para promover el desarrollo de una respuesta inmunitaria especifica[9].

4. RECEPTORES DE LOS LINFOCITOS DE LA INMUNIDAD INNATA.

La actividad citotóxica de las células NK está regulada por receptores que pueden reconocer tanto determinantes de MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de clase I clásicos (HLA-A, B, C) y no clásicos (HLA-G), como ligandos relacionados con MHC (MIC, *MHC class I-related molecules)*. Se han identificado dos familias de receptores. Los receptores KIR, estructuralmente relacionados con inmunoglobulinas (*killer cell immunoglubulin like receptors)* y los receptores tipo lecitina, también llamados NCR *(natural cytotoxicity receptors),* dentro de los que están NKG2D, Ly49 y otros. Los receptores pueden ser activadores o inhibidores; los receptores activadores poseen regiones ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) mientras que los receptores inhibidores poseen secuencias ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifk*) reclutadoras de fosfatasas[1].

A. Receptores Activadores

Para la activación de linfocitos NK es necesario al acoplamiento de sus receptores activadores con el ligando respectivo en la célula “blanco”[10]. Esta interacción específica proporciona el estímulo requerido para la producción de sus citocinas y su actividad citotóxica. El proceso es regulado por receptores inhibidores y citocinas que aumentan, limitan o terminan la respuesta[11].

B. Receptores inhibidores

Desde que los linfocitos NK fueron descubiertos quedó claro que destruyen únicamente células “blanco” que carecen de MHC I apropiado[12].

Actualmente se sabe que los tumores murinos que carecen de moléculas MHC clase I, son atacados de manera preferente por los linfocitos NK, *in vitro* y/o *in vivo.* Basado en esto, se ha propuesto la hipótesis de la “perdida de lo propio”. Esta hipótesis establece que los linfocitos NK pueden detectar en su célula “blanco” moléculas de MHC I anormales e iniciar su eliminación[13]. De ésta manera las células “blanco” susceptibles de ser destruidas por las células NK están caracterizadas por la expresión defectuosa de uno o más alelos de MHC I[14]. La pérdida de la molécula MHC I ocurre frecuentemente en algunas infecciones por virus[15]. Debido a esto, líneas tumorales como la K562 (derivadas de pacientes con leucemia mielocítica crónica), Molt 4 (leucemia linfoblástica aguda) o Daudi (linfoma de Burkitt), son usadas comúnmente como “blanco” para ensayos con células NK, ya que no expresan MHC I [16].

Los linfocitos NK humanos destruyen líneas celulares linfoblásticas transformadas que tienen MHC I deficiente, pero estos linfocitos NK son incapaces de matar éstas células “blanco” cuando son mezcladas con genes HLA-B y HLA-C normales[11]. Por otra parte, ésta hipótesis de la “pérdida de lo propio” no excluye la posibilidad de que células con MHC I normales puedan ser destruidas por los linfocitos NK, pero esto ocurre únicamente con células alogénicas, es decir, células de otro individuo[14].

Para entender el porque de los efectos inhibidores del MHC I en la actividad de los linfocitos NK, se ha propuesto la hipótesis de un “receptor inhibidor”. Esta hipótesis propone que los linfocitos NK expresan en su membrana plasmática, receptores para moléculas de MHC clase I, que discriminan alelos de clase I, y que estos receptores capturan señales que inhiben a los mecanismos de lisis de los linfocitos NK[17].

Como algunos de los ligandos para los receptores activadores de los linfocitos NK son expresados por células sanas, la activación de linfocitos NK está bajo un estricto control negativo llevado a cabo por sus receptores inhibidores polimórficos, que reconocen a los distintos alelos MHC I y evitan la destrucción de células normales por linfocitos NK[10]. Aunque los linfocitos NK expresan receptores para el MHC I propio, todos expresan al menos un receptor inhibidor del MHC I, expresado en las células propias[18], asegurando de ésta manera que puedan ser reconocidos protegiendolos de la citolisis[10].

Un receptor inhibidor de NK de cualquier tipo no interactúa con todos los antígenos MHC I, por lo que cada receptor generalmente identifica un grupo de antígenos MHC I que comparte una región antigénica[15]. Pertenecen a la familia del supergen tipo inmunoglobulina (tipo I) y de las lecitinas tipo C (tipo II). Los más importantes conocidos hasta ahora son: receptores Ly49, KIR, CD94/NK6G2 y KLRE1 los cuales después de la unión de su ligando, los “motifs” citoplasmáticos llamados “ITIMS” son fosforilados, resultando en el reclutamiento y activación de fosfatasas que afectan el señalamiento intracelular mediante la activación de sus receptores[19].

5. RECEPTORES KIR.

A diferencia de los linfocitos T y B, las células NK no requieren el proceso de rearreglo de genes para producir el repertorio de receptores de antígeno[20].

Los linfocitos NK poseen diversos receptores en su membrana plasmática, los cuales regulan su función efectora dependiendo de las señales (ligandos) positivas y negativas que activan o inhiben respectivamente.

Estos receptores tienen una estructura diferente a la del complejo receptor de la célula T y se les denomina “receptores tipo inmunoglobulina” (KIR). Los KIR son glicoproteínas que funcionan como receptores del tipo inmunoglobulina. Pertenecen a un grupo de moléculas reguladoras encontradas en las células linfoides y juegan un papel crítico en el reconocimiento de las moléculas de MHC I propias para proteger a las células normales de la lisis por NK[21]. Al igual que MHC I, los *KIR* muestran un amplio polimorfismo genético[22].

De acuerdo a su función estos receptores se dividen en:

Activadores: Encargados de llevar a cabo la actividad citotóxica (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 y 3DS1).

Inhibidores: Encargados del reconocimiento de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2 y 3DL3)[23].

Los receptores KIR están codificados por una familia de 14 genes aproximadamente, provenientes de un polimorfismo poligénico y agrupados en una región de 150Kb aproximadamente. Este *loci* se localiza en el cromosoma 19q13.4[24-26] dentro del sistema receptor leucocitario (LCR) 1Mb.

Los genes están organizados de una forma en que cada gen tiene una extensión aproximadamente de 10-16Kb con una secuencia que separa cada par de genes de alrededor de 2Kb, excepto por una extensión de 14Kb correspondiente a una secuencia única para el gen 2DL4[24].

6. GENOTIPIFICACIÓN KIR

La genotipificación de genes *KIR* puede ser de un sitio o un alelo específico. Un sitio tipificado solamente detecta la presencia o ausencia de cada gen en un individuo determinado, proporcionando así un perfil del repertorio *KIR.*

El método para la tipificación *KIR*, es la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos (PCR-SSP), descrito primeramente por Uhrberg y colaboradores (1997)[27]. Este método ha sido utilizado para registrar nuevos sitios descubiertos y alelos previamente no detectados[28]. También se ha desarrollado otro método de PCR (sequence-specific oligonucleotide probe; PCR-SSOP)[29] y mas de 100 diferentes perfiles de genotipos *KIR* han sido encontrados[30].

7. KIR EN ENFERMEDADES

Sólo un número limitado de estudios documentan asociaciones genéticas entre genes *KIR* y enfermedades específicas, generalmente debido a la reciente caracterización de sus genes y haplotipos. Las células NK están implicadas en la defensa contra enfermedades infecciosas, particularmente en infecciones virales, a través de mecanismos que participan en citotoxicidad y producción de citocinas[31], probablemente mediado en parte por moléculas estimuladoras KIR.

Los genes *KIR* inhibidores también podrían tener importancia médica, por ejemplo: recientemente se ha reportado que se reducía el riesgo de recaídas en pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) que recibieron transplantes hematopoyéticos discordantes para los ligandos de KIR (esto es, discordante en HLA)[32].

Consecuentemente han sido implicados en diversas enfermedades como leucemia[33], artritis[34,35] y aloreactividad en caso de transplantes[32,36].

La especificidad de unión KIR para grupos de moléculas HLA aumenta la posibilidad de que mecanismos responsables de asociaciones HLA con algunas enfermedades puedan provenir de interacciones con moléculas KIR en células NK o células T, y sólo un número limitado de estudios han prestado fuerte apoyo a esta hipótesis.

La descripción de la diversidad del complejo de genes *KIR* y el desarrollo de sistemas eficientes de tipificación, seguramente fomentarán estudios de asociaciones de enfermedades que varían en alta frecuencia, además ayudará al entendimiento de la función biológica y el equilibrio entre el ajuste de receptores inhibidores y activadores de células NK que se encuentran en tumores y varias infecciones virales de células.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La activación de las células NK depende de las señales captadas por los receptores presentes en su membrana, principalmente por los KIR (receptores tipo inmunoglobulina), los cuales son altamente polimórficos y hasta la fecha no han sido estudiados en poblaciones mexicanas, mientras que en Asia, África, Australia y en familias caucásicas se han identificado desde 7 hasta 14 genes. Tomando en cuenta que el grupo étnico nahua de nuestro país es un grupo social altamente arraigado a sus costumbres y tradiciones y que hasta nuestros tiempos aún existen regiones en las cuales este grupo de personas no ha estado expuesto al entrecruzamiento racial, se espera encontrar diferencias en las frecuencias de estos genes con respecto a los mestizos y al mismo tiempo la descripción de la diversidad del complejo de genes KIR y el desarrollo de sistemas eficientes de tipificación serán la base de estudios de asociación-susceptibilidad a enfermedades y ayudará al entendimiento de la función biológica y el equilibrio entre el ajuste de receptores inhibidores y activadores de células NK.

HIPÓTESIS

a) Hipótesis general:

Debido a que la población nahua ha sido expuesta en menor grado al cruzamiento racial el número de genotipos Yawata encontrados en este grupo será menor que en los mestizos.

b) Hipótesis de trabajo u operacional:

Se encontrarán diferencias significativas entre nahuas y mestizos en los genes 3DL1, 2DS4 y 2DS5 ya que éstos son los que presentan mayor variabilidad en otras poblaciones.

OBJETIVO

Identificar los genes KIR presentes en un grupo étnico (nahuas) y compararlos con los resultados obtenidos para mestizos por la técnica de PCR-SSP.

A. Objetivos particulares.

En un grupo de nahuas identificar la presencia de:

Genes *KIR* activadores.

Genes *KIR* inhibidores.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

A. Tipo de estudio.

Descriptivo.

B. Población.

La población de ésta investigación estuvo compuesta por 58 individuos clínicamente sanos, no relacionados, correspondientes a la población indígena nahua.

El grupo de comparación estuvo compuesto por 86 individuos clínicamente sanos, no relacionados, correspondientes a la población mestiza. Los resultados de esta población fueron tomados de un estudio realizado anteriormente[37]

C. Criterios de inclusión y exclusión.

a) Pertenecer al grupo étnico nahua.
b) Padres y abuelos nacidos en la misma población.
c) No relacionados.
d) Consentimiento informado.

D. Variables.

a) Receptores *KIR* presentes.
b) Genotipos en la población.

MATERIAL

A. Toma de muestra.

- ✓ Vacutainer.
- ✓ Agujas.
- ✓ Tubos de vacío con EDTA.

A. PCR-SSP.

- ✓ Taq polimerasa.
- ✓ Amortiguador de boratos (10X).
- ✓ $MgCl_{2.}$
- ✓ dNTPs.

(Invitrogen, Brasil).

B. Iniciadores.

Las secuencias de los iniciadores para cada gen se tomaron de la bibliografía[23, 28, 38, 39] .

Para el control MIC sentido 5´ CAG ACT TGC AGG TCA GGG GTC CCG y el antisentido 5´ CAA TGA CTC TGA AGC ACC AGC ACT (Invitrogen, Brasil).

C. Electroforesis.

- ✓ Agarosa grado electroforesis (1.5g/100mL).
- ✓ Marcador de pesos moleculares 100bp y 50 bp (invitrogen, Brasil).
- ✓ Amortiguador de boratos TBE (54g Tris base. PM 121.14; 27.5g ácido bórico. PM61.83; 20mL EDTA 0.5M pH 8. Aforar a 1L).

D. Equipo.

- ✓ Termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems).
- ✓ Transiluminador (GELDOC 2000 BIO-RAD).
- ✓ Espectrofotometro (BECKMAN DU 650).
- ✓ Cámara de electroforesis (BIO-RAD).

E. Controles.

Para validar el método se emplearon las líneas celulares: QBL, SA, RSH, AMAI, PITOUT, WT51 y CF996 y como controles dentro de las amplificaciones se incluyeron muestras de ADN de un estudio previamente realizado en el Anthony Notan Research Institute (Londres) donde se identificaron lo genes KIR denominados como: C9, C13, C17, C19, 60ñ, 62ñ, 160ñ, 161ñ, 162ñ, 163ñ, 164ñ,165ñ.

METODOS

A. Toma de muestras y aislamiento de ADN.

Se tomaron 5mL de sangre periférica con vacutainer y en un tubo con EDTA como anticoagulante. Se procedió al aislamiento del ADN genómico utilizando un estuche de Qiagen. Finalmente el ADN se guardó a -70°C hasta el momento de su ensayo.

B. Amplificación del ADN genómico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos (PCR-SSP).

La reacción de PCR-SSP consta de tres pasos los cuales son:

a) Desnaturalización: Este paso se realiza a temperaturas entre 70-90°C y desdobla las cadenas de ADN generando un molde de hebra simple.

b) Alineamiento: Es en este paso donde los iniciadores específicos tienen importancia ya que su secuencia es totalmente complementaria a la del ADN molde y por ello es mas eficiente en las reacciones de amplificación que un iniciador que tenga una o varias bases desapareadas. Los iniciadores se diseñan y las condiciones se ajustan para que se amplifique con gran sensibilidad y especificidad.

c) Elongación: Es la extensión en sentido 5' – 3' del complejo iniciador-sustrato, en presencia de la enzima polimerasa, los nucleótidos (dNTPs) y $MgCl_2$.

Las cadenas recién formadas comienzan un nuevo ciclo, y después de 25 a 30 ciclos se obtiene la cantidad necesaria de amplificado.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 20 segundos a 95°C, 45-60 segundos de 60-68°C y 40-90 segundos a 72°C para los primeros 5 ciclos, después 20 segundos a 95°C, 35-45 segundos de 58-69°C y 30-90 segundos a 72°C para los siguientes 28-32 ciclos y finalmente 7 minutos a 70°C.

C. Electroforesis.

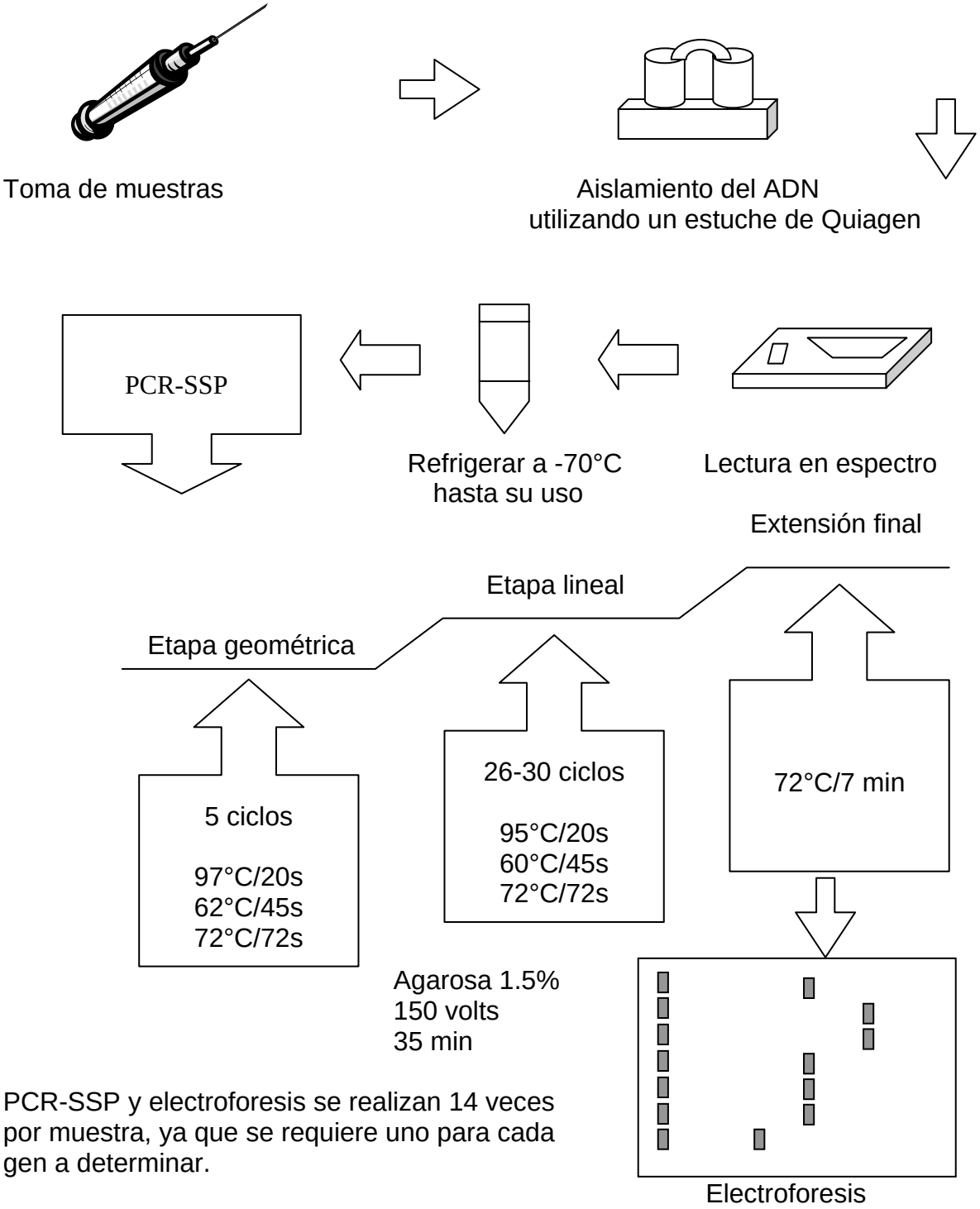
Una vez realizada la amplificación se colocaron 4µL de amortiguador de carga a cada muestra y, se corrieron en geles de agarosa al 1.5% a 140 volts por 35min, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. Las muestras se corrieron junto a dos marcadores de peso, 50pb y 100pb respectivamente, los cuales sirven como referencia para estimar el tamaño de las bandas encontradas y contrastarlo con lo reportado en la bibliografía. Se estableció como amplificación negativa para *KIR* cuando la banda de tamaño esperado estuvo ausente con presencia de la banda del control interno (MIC) o la de los controles positivos.

D. Análisis estadístico.

Como medidas descriptivas se calcularon media y desviación estándar para variables cuantitativas y frecuencias y proporciones para descriptivas.

Como pruebas de comparación se calculó la χ^2 y exacta de Fisher considerando la prueba estadísticamente significativa con un valor de $p<0.05$.

DIAGRAMA DE FLUJO



PCR-SSP y electroforesis se realizan 14 veces por muestra, ya que se requiere uno para cada gen a determinar.

RESULTADOS

Se recolectaron muestras de sangre a 58 individuos del grupo étnico nahua de las cuales se aisló el ADN por la técnica de columnas de Quiagen, se leyó su concentración por espectrofotometría tomando lecturas a 260nm (ADN) y a 280nm (proteínas). La relación 260/280 para un ADN altamente puro es de 1.8[40].

La concentración se calculó multiplicando la absorbancia a 260nm por 50 del factor de doble hélice y por 25 de la dilución.

La media de las concentraciones de ADN fue de 297.54ng/μL con una desviación estándar de 115.46

En cuanto a la relación 260/280 se obtuvo una media de 1.76 con una desviación estándar de 0.06

En las siguientes figuras podemos observar algunos de los resultados de las amplificaciones para los genes KIR:

2DL2.

Se considera que el amplificado se realizó correctamente, ya que la banda MIC se encuentra presente al igual que el control positivo C13, el control negativo 143ñ está ausente y la banda del gen coincide con el tamaño reportado en la bibliografía 1800pb, corroborado con el marcador de peso (Figura 1).

Iniciadores:

2DL2F CCA TGA TGG GGT CTC CAA A

2DL2R GCC CTG CAG AGA ACC TAC A

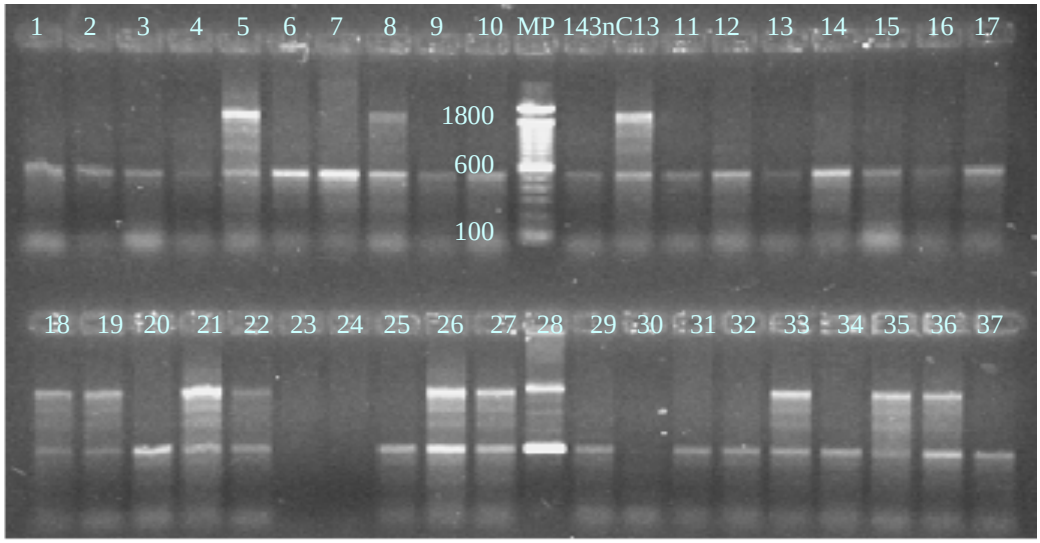


Figura 1. Gel agarosa (1.5%), 140volts 35 min. teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. MP: marcador de peso 100pb; pb: pares de bases.

2DS2.

Se considera que el amplificado se realizó correctamente, ya que la banda MIC se encuentra presente al igual que el control positivo C13 y la banda del gen coincide con el tamaño reportado en la bibliografía 1850pb, corroborado con el marcador de peso (Figura 2).

Iniciadores:

2DS2F TGC ACA GAG AGG GGA AGT A

2DS2R CAC GCT CTC TCC TGC CAA

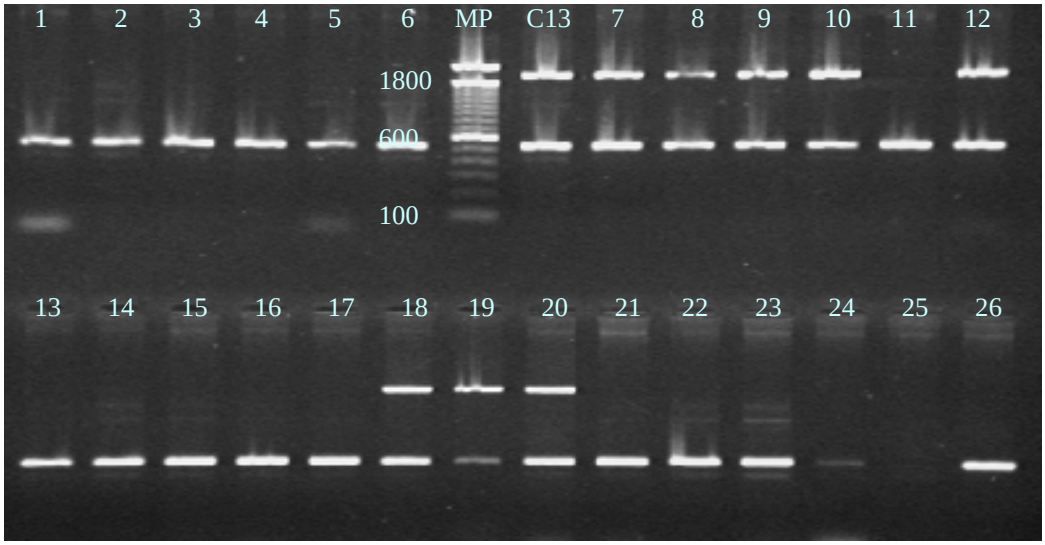


Figura 2. Gel agarosa (1.5%), 140volts 35 min. teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. MP: marcador de peso 100pb; pb: pares de bases.

2DS4.

Se considera que el amplificado se realizó correctamente aún cuando MIC no aparece, ya que se encuentra presente la banda del control positivo 163ñ, el control negativo C13 está ausente y la banda del gen coincide con el tamaño reportado en la bibliografía 2000pb, corroborado con el marcador de peso (Figura 3).

Iniciadores:
2DS4F GGA ATG TTC CGT TGA TGC
2DS4R CTG GCC CTC CCA GGT CA

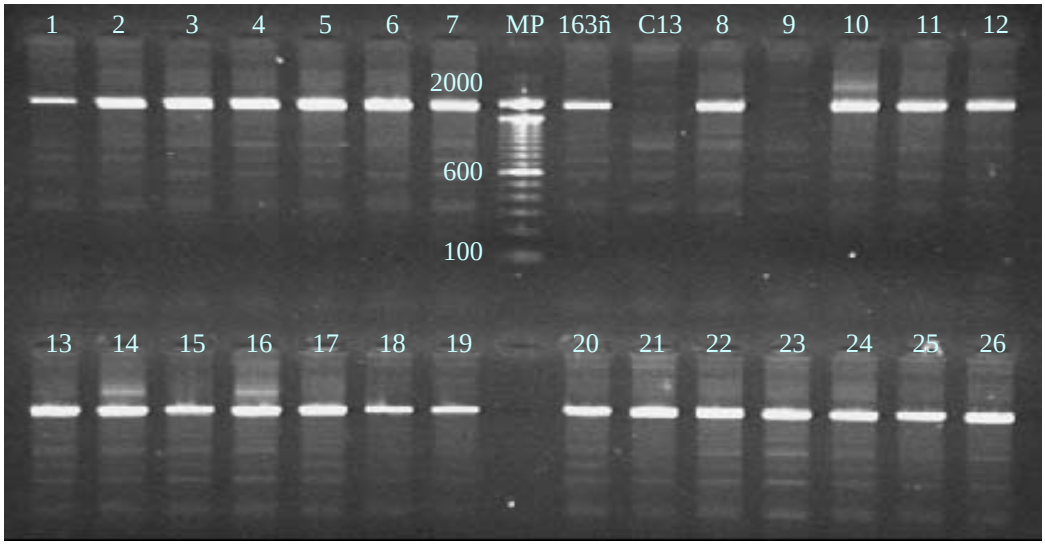


Figura 3. Gel agarosa (1.5%), 140volts 35 min. teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. MP: marcador de peso 100pb; pb: pares de bases.

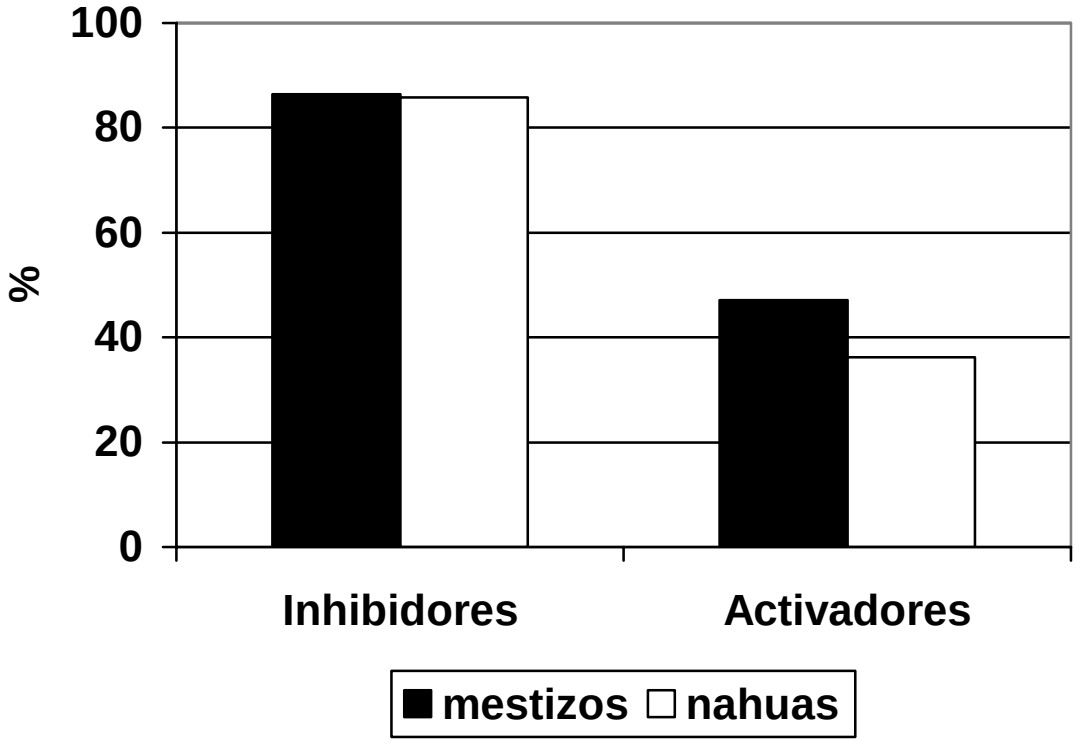
Cuadro 1.Frecuencias de genes KIR por grupo de estudio.

Gen	#nahuas Positivos n = 58	#mestizos Positivos n = 86	Exacta de Fisher	χ^2
2DL1	58 (100%)	86 (100%)	---	---
2DL2	16 (27.5%)	37 (43.0%)	0.0780	0.0877
2DL3	58 (100%)	86 (100%)	---	---
2DL4	58 (100%)	86 (100%)	---	---
2DL5	20 (34.5%)	42 (48.9%)	0.1222	0.1249
3DL1	52 (89.6%)	85* (98.8%)	0.0172	0.0342
3DL2	58 (100%)	86 (100%)	---	---
3DL3	58 (100%)	86 (100%)	---	---
2DS1	18 (31.0%)	36 (41.9%)	0.2211	0.2540
2DS2	18 (31.0%)	38 (44.2%)	0.1209	0.1575
2DS3	8 (13.8%)	15 (17.4%)	0.6466	0.7231
2DS4	52 (89.6%)	84* (97.7%)	0.0608	0.0911
2DS5	12 (20.7%)	34* (39.5%)	0.0188	0.0281
3DS1	18 (31.0%)	36 (41.9%)	0.2211	0.2540

*χ^2 y prueba exacta de Fisher, $p<0.05$.

El valor de p fue calculado mediante un programa de computadora (in stat 3). Se realizó la prueba exacta de Fisher y Ji cuadrada en las que se considera que se requiere un valor de $p< 0.05$ para que exista una diferencia significativa.

Figura 4. Porcentaje de genes Inhibidores y activadores.



Existe mayor frecuencia de genes inhibidores que de activadores aunque con menor variabilidad.

Cuadro 2. Genotipos de KIR en nahuas y mestizos.

2DL					3DL			2DS					3DS	Genotipo	Genes	Mestizos	Nahuas
1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1	#	#	%	%
■		■	■		■	■	■				■			1	7	38.4	48.3
■		■	■	■	■	■	■	■			■	■	■	4	11	16.3	3.4
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	8	13	12.8	6.9
■	■	■	■		■	■	■		■		■			2	9	12.8	17.2
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5	14	8	0
■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■			3	11	5.8	0
■		■	■	■	■	■	■	■		■	■		■	12	11	1.2	10.3
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	6	13	1.2	0
■	■	■	■	■		■	■	■	■			■	■	17	11	1.2	3.4
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	28	12	1.2	0
■		■	■	■	■	■	■		■	■	■			57	10	1.2	3.4
■		■	■	■		■	■	■				■	■	24	9	0	6.89

Los espacios sombreados indican presencia del gen y los espacios en blanco indican ausencia, en las columnas de la derecha se muestran las frecuencias, el número de genes y el número de genotipo (tomados de Makoto Yawata) de los dos grupos.

ANALISIS DE RESULTADOS

De acuerdo con el conocimiento de que el grupo de genes *KIR* es altamente polimórfico, la comparación de frecuencias de éstos entre las poblaciones estudiadas muestra diferencias estadísticamente significativas en los genes 3DL1, 2DS4 y 2DS5, lo que sienta las bases para posteriores estudios de asociación-susceptibilidad a enfermedades ya que de estar implicados en algún padecimiento los nahuas podrían ser genéticamente mas resistentes o susceptibles que los mestizos.

Los genes activadores *KIR* 2DS1, 2DS2, 2DS5 y 3DS1 y los inhibidores *KIR* 2DL2 y 2DL5 muestran una gran variabilidad en cuanto a su frecuencia mientras que en los activadores 2DS3 y 2DS4 y el inhibidor 3DL1 se presentó una frecuencia similar, además de que se encontraron genes con frecuencia del 100% 2DL1, 2DL3, 2DL4 3DL2 y 3DL3 para ambos grupos. Ambos datos son similares a los encontrados en Caucásicos[3, 6-8], Japoneses[9] y Coreanos[10].

Los genes inhibidores 2DL1 y 2DL3 han estado presentes en casi todas las muestras (95-100%) de Irlandeses, Caucásicos, Asiáticos, Japoneses y Mexicanos (nahuas y mestizos como grupo de comparación). 3DL3 se muestra en alta frecuencia (>70%) en Japoneses y Mexicanos. Con respecto a los genes activadores, el gen 2DS4 también está en una frecuencia elevada (>85%) al igual que en población Méxicana. Por otra parte, otro gen activador 2DS5 estuvo ausente en Caucásicos, Australianos y Vietnamitas[41], pero presente en baja frecuencia (<40%) en Mexicanos, Africanos, Palestinos, Asiáticos y Japoneses, lo cual sugiere que es un receptor poco común[27,42]. .

El análisis de frecuencia de los genes *KIR* para los dos grupos muestra mayor variación en los genes activadores. Las frecuencias de la mayoría de los genes *KIR* observados en nuestra población caen dentro de los límites establecidos en estudios previos reportados en las poblaciones Caucásica, Vietnamita[41], Asiática[42], Africana[43] y Japonesa[44], entre otras, ya que en todas éstas poblaciones también se ha encontrado una frecuencia mayor de genes inhibidores (>80%) con respecto a los genes activadores (<50%), con excepción de dos genes inhibidores 2DL5 y 3DL3 (que no son encontradas en la mayoría de las poblaciones). El caso contrario ocurre en la población aborigen Australiana donde las frecuencias de los genes son mayores para los genes activadores (>80%) que para los inhibidores (excepto 2DL2 <80%)[41].

Esta prevalecía en la frecuencia de receptores inhibidores quizá sea debido a la importancia de los receptores inhibidores en la activación de los linfocitos NK.

El contenido de genes *KIR* fue agrupado en genotipos encontrando que el genotipo número 1 para ambos grupos seguido del número 4 para mestizos y del 2 para nahuas.

En la población mexicana encontramos 11 genotipos para mestizos y 8 para nahuas de los más de 100 genotipos que han sido identificados. El mayor numero de genotipos ha sido encontrado en Hindus del norte de la India[45], y Griegos[46] (47 y 45 genotipos respectivamente). El número más bajo fue encontrado en Japoneses[44], aborígenes Australianos y Vietnamitas[41] (8, 6 y 5 genotipos respectivamente) esto nos habla de lo cerrada que puede llegar a ser una población y de la similitud entre sus miembros.

Estos datos confirman que la población mestiza es una población más abierta genéticamente hablando, esto significa que es una población con mayor mezcla genética en el transcurso del tiempo a diferencia de los grupos étnicos que como los nahuas han preservado su identidad indígena a través del tiempo como resultado de su poca participación en la mezcla de razas.

Comparando a la población nahua con otras poblaciones mexicanas como tarahumara, purepecha y huichol, encontramos similitudes en la mayor variabilidad de los genes inhibidores sobre los activadores, así como una mayor frecuencia de ellos, los mismos genes con frecuencias del 100% (2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL2 y 3DL3), un número de genotipos semejante ya que se observaron 8 para nahuas y 8, 6 y 5 para huicholes, purepechas y tarahumaras respectivamente (todos ellos menor a los 11 encontrados para mestizos).

En tanto al genotipo más frecuente solo existe diferencias con la población tarahumara la cual coincide con los mestizos, siendo el número 4 el mas frecuente para estos dos grupos mientras el numero 1 es el de mayor frecuencia para las otras poblaciones.

Sin embargo, la diferencia significativa entre estos grupos se encuentra en los genes activadores y son 2DS1, 2DS4 y 2DS5 para huicholes y purepechas y estos mismos más 2DS3 para tarahumaras[37] lo que podría implicar diferencias en cuanto a resistencia y susceptibilidad a enfermedades entre estas poblaciones.

En este estudio se demuestra que la población Mexicana posee características semejantes a las reportadas en varias poblaciones del mundo (Caucásicos, Asiáticos, Africanos, Japoneses, etc.). Ya que los mestizos provienen de tres grupos: indígenas, africanos y españoles y adicionalmente estos grupos han sido influenciados por europeos, principalmente franceses, alemanes e inmigrantes italianos o bien, por gente de Norte América y Asia, especialmente de Japón.

Esta basta diversidad biológica podría ser la razón para las similitudes encontradas con otras poblaciones ya estudiadas. Sin embargo, las discrepancias observadas podrían confirmar el papel significativo de la distribución geográfica y de la difusión de varios perfiles (cultura, civilización, creencias, etc.).

CONCLUSIONES

Los genes KIR activadores presentan mayor variabilidad aunque menor frecuencia que los inhibidores en ambos grupos.

El número de genotipos encontrados fue mayor para mestizos que para nahuas (11 y 8 respectivamente).

Existen diferencias significativas entre mestizos y nahuas en los genes 3DL1, 2DS4 y 2DS5.

La población mestiza es una población más abierta genéticamente en comparación a los nahuas.

Cuadro 3 que muestra los diferentes genotipos KIR tomado de Yawata Makoto[8].

	2DL					3DL			2DS					3DS
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1
1	■	□	■	■	□	■	■	■	□	□	□	■	□	□
2	■	■	■	■	□	■	■	■	□	■	□	■	□	□
3	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□
4	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■
5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■
7	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□
8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■
9	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	□	■
10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	□
11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■
12	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	□	■
13	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	■
14	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
15	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	□
16	□	■	□	■	□	■	■	■	□	■	□	■	□	□
17	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	■
18	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■
19	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□
20	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■
21	■	□	■	■	□	■	■	■	□	■	□	■	□	□
22	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■
23	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■	■
24	■	□	■	■	■	□	■	■	■	□	□	□	■	■
25	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□	□
26	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	□
27	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■
28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■
29	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	■
30	■	■	□	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	■
31	■	■	□	■	□	■	■	■	□	□	□	■	□	□
32	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□	□
33	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■	■	□
34	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■	□	□
35	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	□	■
36	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	□	■	□	□
37	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■	■	■
38	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■	■	□
39	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	□
40	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	□
41	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■
42	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	■
43	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□	□
44	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■
45	■	□	■	■	■	□	■	■	■	□	■	□	■	■
46	□	■	■	■	□	■	■	■	□	■	□	■	□	□
47	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□
48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□
49	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□	■
50	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	□	□	□
51	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	□	□	■
52	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□
53	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	□
54	■	■	□	■	■	□	■	■	■	■	□	□	□	■
55	■	■	□	■	■	□	■	■	■	□	□	□	■	■
56	■	■	□	■	□	■	■	■	□	■	□	■	□	□
57	■	□	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□
58	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	□	□
59	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	■
60	■	□	■	■	■	□	■	■	■	■	□	□	□	■
61	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	□	■
62	■	□	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□	□
63	■	■	■	□	■	□	■	■	■	■	□	□	■	□
64	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
65	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■
66	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
67	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■
68	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	■
69	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■
70	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	□	□
71	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■
72	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	□
73	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■
74	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■
75	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	□	□	□
76	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■	■	■
77	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	□	■	□
78	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□
79	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■
80	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	□
81	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■
82	■	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■
83	■	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	■	□	■
84	■	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	■	□	□
85	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■
86	■	■	□	■	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□
87	■	■	□	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■	■
88	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	□
89	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■
90	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■
91	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■
92	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	■	■	□	□
93	■	□	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	□	□
94	■	□	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■	■	□
95	■	□	■	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■

REFERENCIAS

1. Rojas EO. Inmunología de memoria. 2a ed. México: Panamericana; 2001.p.1-9.

2. Lawrence EM. Genética de las poblaciones y evolución. México: Hispano Americana; 1979.p.33-34.

3. Thompson M, Mclnnes R, Willard H. Genética en medicina. 4a ed. Barcelona: Masson; 1996.p.5-9.

4. Perfil Sociodemográfico de la población hablante de náhuatl. INEGI: puede consultar en: URL: http://www.inegi.gob.mx/poblacion_indigena

5. Viesca TC. Medicina prehispánica de México. México: Panorama; 1994.p.7-10.

6. Nemirovsky M. Fundamentos de inmunología. México: Trillas; 2003.p.165.

7. Abbas A. Inmunología celular y molecular. 2a ed. España: Interamericana Mc. Graw Hill; 1995.p.308-310.

8. Chapel H. Essentials of clinical immunology. 4a ed. Oxford: Blackwell Science; 1999.p.22.

9. García M, Patricia C, Cocom G, Mirza C, Mut M. Los receptores de los linfocitos de la inmunidad innata. Biomed 2004;15:113-122.

10. Long E, Wagtmann N. Natural killer cell receptors. Curr Opin Immunol 1997;9:344-50.

11. Lainer LL. NK cell receptors. Annu Rev Immunol 1998;16:359-93.

12. Mandelboim O, Malik P, Davis D, Jo C, Boyson J, Strominger J. Human CD16 as lysis receptor mediating direc natural killer cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci 1999;96:5640-4.

13. Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman, Allen R, O´Callaghan C. Human myelomonocityc cell express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. J immunol 1998;160:3096-100.

14. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari M. Receptors for HLA Class-I molecules in human natural killer cells. Annu Rev Immunol 1996;14:619-48.

15. Seaman WE. Natural killer and natural killer T cells. Arthritis Rheum 2000;43:1204-17.

16. Robertson M, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood 1990;12:2421-38.

17. Raulet DH. Developmen and tolerance of natural killer cells. Curr Opin Immunol 1999;11:129-34.

18. López BM, Bellón T. Natural killer cell activation an inhibition by receptors for MHC class I. Curr Opin Immunol 1999;11:301-7.

19. Lainer LL. Natural killer cell receptor. Curr Opin Immunol 2003;15:308-14.

20. Borregaard N, Elsbach P, Ganz T, Garred P, Svejgaard A. Innate immunity : from plants to humans. Immunol Today 2000;21:68-70.

21. Sun P. Structure and funtion of natural killer cell receptors. Immunol Res 2003;27:539-48.

22. Parham P. Events in the adaptation of natural killer cell receptors to MHC class I polymorphisms. Immunol Res 1997;148:190-4.

23. Gomez LN, Vilches C. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update.Tissue Antigens 2002;59:184.

24. Trowsdale J, Barten R, Haude A. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. Immunol Rev 2001;181:20-38.

25. Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cell. Science 1995;268:405-8.

26. Andrea D, Chang C, Franz-Bacon K. Molecular cloning of NKB1 a natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. J Immunol 1995;155:2306-10.

27. Uhrberg M, Parham P, Wernet P: Definition of gene content for nine common group B haplotypes of Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. Immunogenetics 2002;54:221.

28. Cook MA, Moss PA, Briggs DC. The distribution of 13 KIR locci in UK blood donors from 3 ethnic groups. Eur J immunogenet 2003;30:213.

29. Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Developmen of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertories. Tissue Antigens 2000;56:313.

30. Yawata M; Yawata N; Abi RL, Parham P: Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. Crit Rev Immunol 2002;22:436.

31. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar MT. Natural killer cells in antiviral defense: function y regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol 1999;17:189.

32. Ruggeri L, Cappani M, Urbani E. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science 2002;295:297.

33. Nowakowski GS, Morice WG, Phyliky RL, Ly CY, Teferri A. Human leucocyte antigen class I and killer immunoglobulin-like receptor expression patterns in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. Br J Haematol 2005;128:490.

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

35. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, etal. Mayor histocompatibility complex class I recognizing receptors are disease risk genes in rheumatiod arthritis. J Exp Med 2001;193:1159.

36. Jones DC, Young NT, . Natural killer receptor repertoires in transplantation. Eur J Immunogenetics 2003;30:169.

37. Gutiérrez ME, Sandoval RL, Díaz FM, etal. KIR gene in ethnic and mestizo population from México. Hum Immunol 2006;67:85-93.

38. Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism: J immunol 2001;166:2992-3001.

39. Shilling HG; Guethlein LA, Cheng NW, etal. Allelic Polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. Immunol 2002;168:2307.

40. Maniatis. Molecular cloning a laboratory manual. 2a. ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.p.27.

41. Toneva M, Lepage V, Lafay G, etal. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. Tissue Antigens 2001;57:358.

42. Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequence in three ethnic groups. Immunogenetics 2001;52:195.

43. Norman PJ, Carrington CV, Byng M, etal. Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. Genes and immunity 2002;3:86.

44. Yawata M, Yawata N, McQueen KL, etal. Predominate of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertories of KIR expression. Immunogenetics 2002;54:543.

45. Rajalingam R, Krausa P, Shilling HG, etal. Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. Immunogenetics 2002;53:1009.

46. Niokou D, Spyropoulou VM, Darlamitsou A, Stavropoulos GC. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. H. Immunol 2003;64:1167.