



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**“Análisis del polimorfismo del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**HERNÁNDEZ ALONSO DEISSY LUZ GUADALUPE**

DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez**

ASESOR INTERNO:

**Q.F.B. Patricia Vidal Millán**



México D.F. Junio 2010.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN  
ESCOLAR  
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna HERNÁNDEZ ALONSO DEISSY LUZ GUADALUPE  
con número de cuenta 404074522 de la carrera de Q. F. B.,  
se le ha fijado el día 14 del mes de junio de 2010 a las 15:00 hrs.,  
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes  
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

|            |                                       |
|------------|---------------------------------------|
| PRESIDENTE | DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA            |
| VOCAL*     | DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ   |
| SECRETARIO | Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN          |
| SUPLENTE   | DRA. RAQUEL RETANA UGALDE             |
| SUPLENTE   | Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA |

El título de la tesis que se presenta es: **Análisis del polimorfismo  
del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana.**

Opción de titulación: *Tesis Experimental*

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F. a, 17 de mayo de 2010.

C. D. ALFREDO SALVADOR SÁNCHEZ FIGUEROA  
DIRECTOR

DIRECCIÓN

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES  
Y DE GRADO

Vo Bo.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Histocompatibilidad,  
de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de  
Pediatría del CMN- SXXI del IMSS,  
bajo la dirección de la Doctora en C. Martha E. Pérez Rodríguez  
y la asesoría de la QFB. Patricia Vidal Millán  
de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza,  
UNAM.

**El presente trabajo recibió los siguientes apoyos:**

Fondo para el Fomento a la Investigación (FOFOI)

2005/1/I/016

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

CONACYT N° 14019

CONACYT-SNI estudiantes-103023

## DEDICATORIA

*La realización de esta tesis refleja una meta cumplida, lo cual, no hubiera sido posible sin el apoyo de las personas más importantes en mi vida, a quien quiero dedicar la presente:*

***A mis padres** Antonio y Alicia, por que gracias a ellos he realizado uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso amor, apoyo y confianza que en mi han depositado, y por que sin escatimar esfuerzo alguno siempre me han apoyado y motivado a seguir adelante, así, he logrado terminar mis estudios profesionales que constituyen el legado más grande que pudiera recibir y por lo cual les viviré eternamente agradecida.*

***A mi hermano y hermanas** Juan, Jesica y Josefín, por ser parte esencial de la familia y brindarme su apoyo incondicional en todo momento.*

***A mi novio** Marco, por ser una de las personas más importantes en mi vida, por que con su amor, cariño, apoyo y comprensión, siempre me motiva a seguir adelante y nunca darme por vencida.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda y apoyo me alentaron a lograr esta meta:*

*A la Dra. en C. Martha E. Pérez Rodríguez, por aceptarme en su proyecto de investigación y haber sido mi directora de tesis.*

*A la Q.F.B. Patricia Vidal Millán, por haber sido mi asesora y apoyarme en todo momento en la realización de esta tesis.*

*A todos y cada uno de mis profesores de la FES-Zaragoza, y muy en especial a los profesores: Patricia Vidal, Pablo Juárez, Rubén Marroquín y Raquel Retana, grandes profesores, a quienes admiro y respeto por su inteligencia y sabiduría, pero sobre todo por su compromiso mostrado ante la enseñanza y formación de los alumnos, pues son de los profesores que realmente dejan huella en la formación académica de los alumnos.*

*A mis compañeros y amigos de la generación, con los que he compartido estos años de esfuerzo y dedicación, en especial a Blanca, Bety, Anel, Mauro, Javier y Paco, con quienes compartí los últimos y más difíciles semestres de la carrera, por su gran compañerismo y apoyo no solo en lo académico si no en todo momento.*

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. ABREVIATURAS</b> .....   | 1  |
| <b>2. RESUMEN</b> .....  | 2  |
| <b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 3  |
| <b>4. MARCO TEÓRICO</b>  |    |
| <b>4.1.- GENES MIC (<i>MHC CLASS I CHAIN-RELATED GENE</i>)</b>               |    |
| 4.1.1. Descubrimiento de genes MIC.....                                      | 4  |
| 4.1.2. Ubicación de genes MIC.....   | 5  |
| 4.1.3. Organización genética y estructura molecular de genes MIC.....        | 6  |
| 4.1.4. Expresión y función de genes MIC.....                                 | 8  |
| 4.1.5. Polimorfismo de genes MIC.....  | 10 |
| 4.1.6. Nomenclatura de genes MIC.....  | 12 |
| 4.1.7. Alelos de genes MIC.....  | 13 |
| 4.1.8. Diferencia entre MICA y MICB.....                                     | 15 |
| 4.1.9. Estudio del polimorfismo de MICB en diferentes poblaciones.....       | 17 |
| 4.1.10. Asociación de alelos MICB con diferentes enfermedades.....           | 19 |
| <b>5. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....                   | 21 |
| <b>6. OBJETIVOS</b>  |    |
| 6.1. Objetivo general.....   | 22 |
| 6.2. Objetivo específico.....  | 22 |
| <b>7. HIPÓTESIS</b> .....  | 23 |
| <b>8. MÉTODO</b>   |    |
| 8.1. Población en estudio.....   | 24 |
| 8.2. Material biológico.....   | 24 |
| 8.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....                    | 24 |
| 8.4. Extracción y cuantificación de DNA.....                                 | 26 |
| 8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....                          | 26 |
| 8.6. Electroforesis en gel de agarosa.....                                   | 27 |
| 8.7. Técnica de SSOP ( <i>Sequence Specific Oligonucleotide Probe</i> )..... | 28 |
| 8.8. Interpretación de resultados y análisis estadístico.....                | 29 |



## **9. RESULTADOS**

|  |           |
|--|-----------|
| 9.1. Amplificación del gen MICB por PCR.....   | 30        |
| 9.2. Tipificación alélica del gen MICB.....  | 31        |
| 9.3. Frecuencia alélica del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana.....       | 34        |
| 9.4. Distribución alélica del gen MICB en Mexicanos comparada con otras poblaciones..... | 36        |
| 9.5. Frecuencia genotípica del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana.....    | 37        |
| <br>   |           |
| <b>10. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>   | <b>38</b> |
| <br>   |           |
| <b>11. CONCLUSIÓN.....</b>   | <b>41</b> |
| <br>   |           |
| <b>12. SUGERENCIAS.....</b>  | <b>41</b> |
| <br>   |           |
| <b>13. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>42</b> |

## 1. ABREVIATURAS

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>a.a:</b>                     | Aminoácido   |
| <b>APC:</b>                     | Célula presentadora de antígeno  |
| <b>CSPD:</b>                    | Disodico 3-metoxispiro (1,2 dioxetano-3,2'-5'-cloro) triciclo (3,3,1,1, <sup>3,7</sup> decano-4-1-fenil fosfato) |
| <b>DNA:</b>                     | Ácido desoxirribonucleico  |
| <b>GM-CSF:</b>                  | Factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos   |
| <b>HCMV:</b>                    | Citomegalovirus humano   |
| <b>HLA:</b>                     | Antígeno leucocitario humano   |
| <b>HSP:</b>                     | Proteínas de choque térmico  |
| <b>IFN-<math>\gamma</math>:</b> | Interferón gamma   |
| <b>MHC:</b>                     | Complejo principal de histocompatibilidad  |
| <b>MIC:</b>                     | Gen relacionado con la cadena de clase I del MHC   |
| <b>MICA:</b>                    | Gen A relacionado con la cadena de clase I del MHC   |
| <b>MICB:</b>                    | Gen B relacionado con la cadena de clase I del MHC   |
| <b>mRNA</b>                     | Ácido ribonucleico mensajero   |
| <b>NK:</b>                      | Células <i>Natural Killer</i>  |
| <b>NKG2D:</b>                   | Receptor del grupo 2D de las células <i>Natural Killer</i>   |
| <b>PCR:</b>                     | Reacción en Cadena de la Polimerasa  |
| <b>pb:</b>                      | Pares de bases   |
| <b>SSOP:</b>                    | Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica   |
| <b>TNF:</b>                     | Factor de Necrosis Tumoral   |
| <b><math>\beta_2</math>m:</b>   | Beta 2 microglobulina  |

## 2. RESUMEN

### **Introducción:**

Los genes MIC (*MHC class I chain related genes*) fueron descubiertos por Bahram y colaboradores en el año de 1994. Esta familia de genes esta integrada por siete miembros, dos genes MICA y MICB, y cinco pseudogenes MICC a MICG. Estos genes han resultado ser polimórficos. Actualmente, se conocen 64 variantes alélicas para MICA y de 30 para MICB. La identificación de los nuevos alelos ha estado motivada por el creciente interés de conocer la asociación de esta nueva familia de genes en estudios de poblaciones, así como, su vínculo con los genes HLA-B y su asociación con determinadas patologías.

**Objetivo:** Llevar acabo la tipificación del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana, empleando sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP).

**Metodología:** El estudio incluyó a 315 individuos sanos no relacionados de una población mestiza e indígena Mexicana, se obtuvo DNA genómico de sangre venosa anticoagulada con EDT; se amplificó específicamente el exón 2 al 5 del gene MICB, con la posterior hibridación con sondas de oligonucleótidos secuencia específica (SSOP) marcados con digoxigenina 3'DIG.

**Resultados y Discusión:** Los resultados obtenidos en la tipificación del gen MICB revelaron que de los 30 alelos conocidos a la fecha, 12 fueron encontrados en población mestiza y 14 en indígenas.

**Conclusiones:** Por medio de la técnica molecular PCR-SSOP se logró la tipificación alélica del gen MICB en población Mexicana, encontrando a *MICB\*00502/\*010* (0.721 y 0.708), como el alelo más frecuente, seguido de los alelos *MICB\*00401v* (0.137 y 0.028), *MICB\*009N* (0.016 y 0.060) y *MICB\*00401* (0.026 y 0.024).

### 3. INTRODUCCIÓN

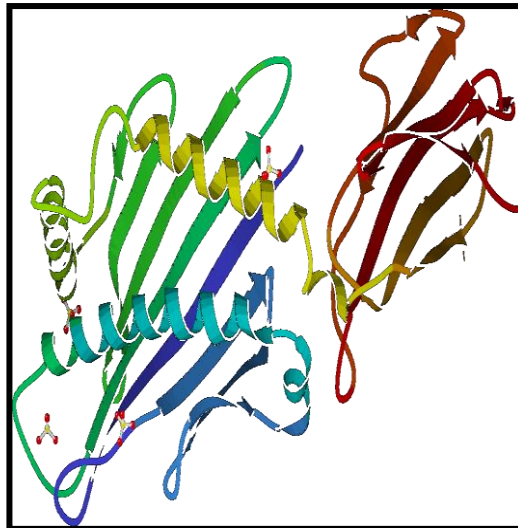
La familia de genes MIC fue descubierta por Bahram y colaboradores en el año de 1994. Integrada por siete miembros, dos genes MICA y MICB, y cinco pseudogenes MICC a MICG. Los genes MICA y MICB se expresan constitutivamente en fibroblastos y células epiteliales. Su expresión se ve aumentada en respuesta al estrés celular, en células infectadas por virus y en presencia de células tumorales. Son reconocidos por las células CD8+, NK y linfocitos T $\gamma\delta$  a través del receptor NKG2D. Estos genes han resultado ser polimórficos, actualmente se conocen 64 variantes alélicas para MICA y 30 para MICB. La identificación de los nuevos alelos ha estado motivada por el gran interés de estudiar esta nueva familia de genes en diversas poblaciones, así como, su asociación con el *locus* HLA-B por su cercanía y su relación con diferentes enfermedades como: Artritis Reumatoide, Cáncer Cervical, Enfermedad de Addison Autoinmune, Colangitis Esclerosa, entre otras. Existen investigaciones donde, se ha estudiado el polimorfismo del gen MICB en poblaciones (españoles, orientales, etc.). Sin embargo, no conoce el polimorfismo de este gen en población Mexicana. Este trabajo tuvo por objetivo llevar a cabo la tipificación de MICB en población mestiza e indígena Mexicana empleando la técnica molecular PCR-SSOP, así como, determinar las frecuencias con que se presentan los diferentes alelos en la población estudiada. El estudio se realizó en 315 individuos Mexicanos, de los cuales 190 pertenecen a población mestiza y 125 a personas de origen indígena (43 Mayas, 68 Huicholes y 14 Tarahumaras). Los resultados revelaron que el alelo *MICB\*00502/\*010* fue el más frecuente (0.721 y 0.708), seguido de *MICB\*00401v* (0.137 y 0.028), *MICB\*009N* (0.016 y 0.060), *MICB\*00401* (0.026 y 0.024). Dichos resultados muestran la diversidad genética de la población y son útiles como referencia para estudios a futuro donde se investigue la asociación de los polimorfismos de *MICB* con determinadas patologías.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. GENES MIC (*MHC CLASS I CHAIN-RELATED GENE*)

#### 4.1.1. Descubrimiento de genes MIC

Estudios enfocados en buscar nuevas secuencias codificantes en la región cercana al *locus* HLA-B27 relacionadas con enfermedades reumatoides e inflamatorias, dieron origen al descubrimiento de los genes MIC (Figura 1). Las proteínas MIC fueron descubiertas como un segundo linaje de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) clase I en mamíferos, por Bahram y colaboradores en el año de 1994 (Bahram *et al.*, 1994). A las moléculas MIC también se le conoce como PERB11 (*Perh Beta Blok Transcript 11*) (Leelayuwat *et al.*, 1994). Estos genes se encuentran en la mayoría de especies de mamíferos estudiados hasta el momento, pero están ausentes en roedores como la rata (Günther *et al.*, 2001) o ratón (Kumanovics *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Estructura molecular tridimensional del Gen MICB.

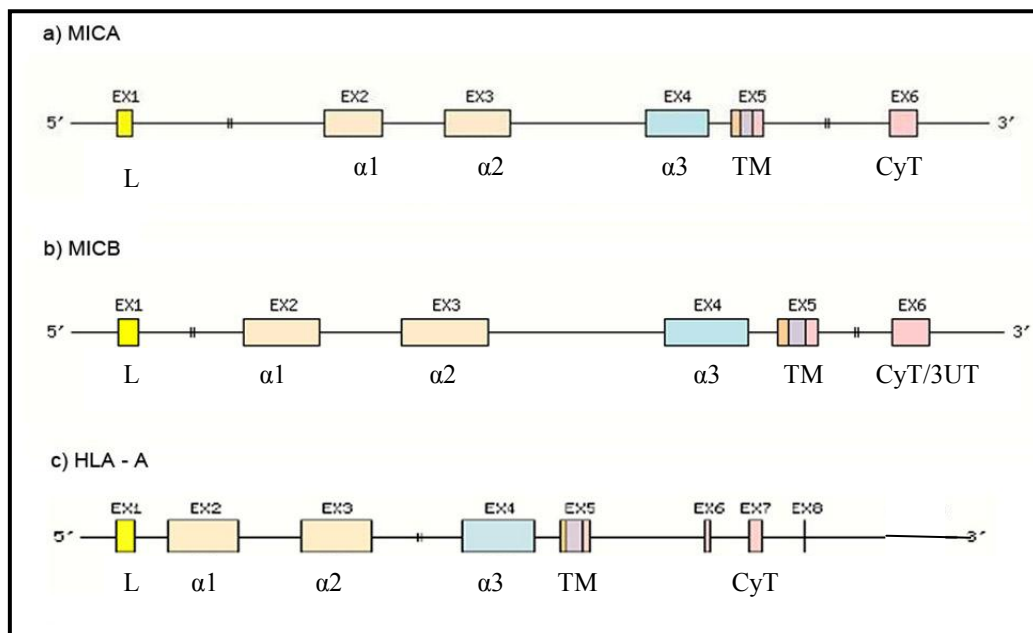
Tomado de PubMed, 2009.



### 4.1.3. Organización genética y estructura molecular de genes MIC

La organización genética de las moléculas MIC comprende 6 exones separados por sus correspondientes intrones, el primer exón codifica para el péptido líder, y el segundo, tercero y cuarto para los dominios alfa 1 ( $\alpha 1$ ), alfa 2 ( $\alpha 2$ ) y alfa 3 ( $\alpha 3$ ) respectivamente, el segmento transmembrana es codificado por el quinto exón y la región intracitoplasmática, así como, el fragmento 3'UT por el exón seis (Bahram *et al.*, 1994; Ando *et al.*, 1997) (Figura 3).

Una comparación de las proteínas MIC con las moléculas MHC-I, muestra que éstas son codificadas por 8 exones, pero al igual que MIC también presentan intrones, el primer exón codifica para el péptido líder, el segundo, tercero y cuarto para los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de la cadena pesada, el quinto exón para el segmento transmembrana y a diferencia MIC la región intracitoplasmática es codificada por los exones seis, siete y ocho (Malissen *et al.*, 1982, Jordán *et al.*, 1985) (Figura 3). Además los genes MHC-I se unen a la  $\beta 2$  microglobulina, proteína que esta formada por cuatro exones, el primero codifica para el péptido líder y los tres siguientes para la molécula completa (codificada en el cromosoma 15 humano) (Gussow *et al.*, 1987).

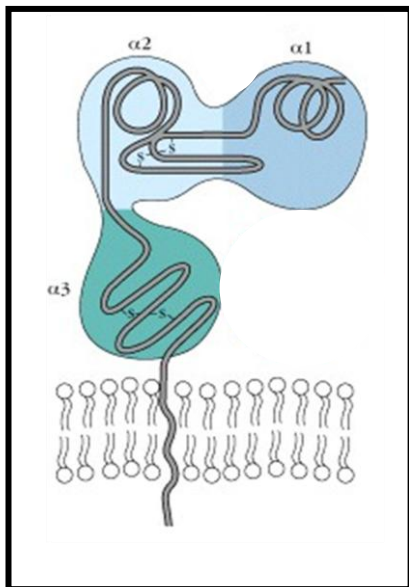


L: péptido líder; TM: Transmembranal; CyT: Citoplasmática.

**Figura 3:** Organización genética de las proteínas MIC en comparación con los genes MHC-I.

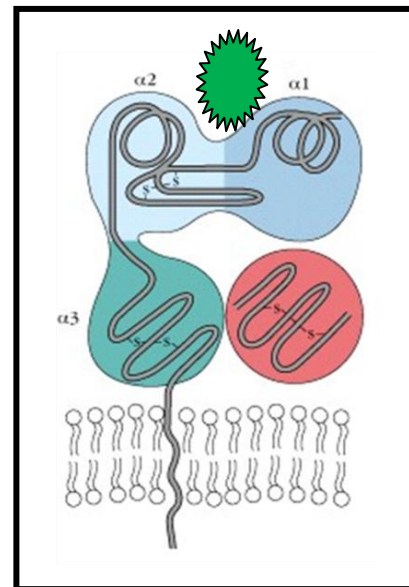
Modificado de <http://imgt.cines.fr>.

Como se menciono anteriormente, las moléculas MIC tienen una estructura molecular semejante a las proteínas clase I del MHC ya que están formadas por 3 dominios  $\alpha$ , seguidos de una parte transmembrana y un tallo citoplasmático (Figuras 4 y 5); Sin embargo, al realizar una comparación entre ambas moléculas se demuestra que comparten una similitud de tan sólo 19%, 25% y 35% con los segmentos  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  respectivamente (Bahram *et al.*, 1994, Bahram y Spies 1996b). Además los genes MIC no se unen a la  $\beta_2$ -microglobulina para su expresión en la superficie celular (Li *et al.*, 1999), presentan pérdida del sitio de unión al receptor CD8 y no tienen función como presentadoras de antígeno (Bahram *et al.*, 2000, Groh *et al.*, 1996, Li *et al.*, 1999).



**Figura 4:** Estructura molecular de MIC.

Tomado de Goldsby *et al.*, 2000.



**Figura 5:** Estructura molecular del MHC-I.

Tomado de Modificado de Goldsby *et al.*, 2000.



#### 4.1.4. Expresión y función de genes MIC

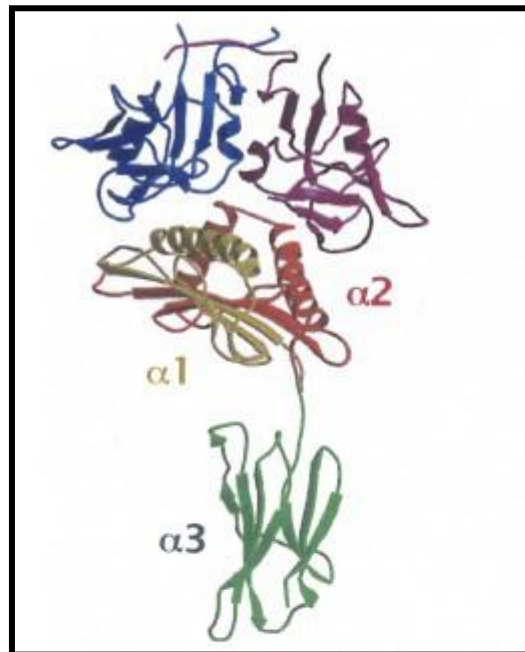
Los genes MIC se expresan en el epitelio intestinal, fibroblastos, células endoteliales, citoplasma de monocitos y queratinocitos, líneas celulares epiteliales y células T activadas (Groh *et al.*, 1999, Molinero *et al.*, 2004, Stephens *et al.*, 2001), pero no en células de linaje linfohematopoyético (Groh *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2007). La expresión de MICB esta regulada por las proteínas de choque térmico (HSP70) (Steinle *et al.*, 1998, Groh *et al.*, 1996), pero no por interferón gama (INF $\gamma$ ) (Bahram y Spies 1996b). Los niveles de expresión de estas proteínas pueden verse afectados mostrando una elevación en respuesta a estrés celular, infecciones virales, enfermedades autoinmunes, células tumorales (Zou *et al.*, 2005, Azimi *et al.*, 2006, Groh *et al.*, 1999), estrés oxidativo, el cual, induce daño celular alterando las proteínas, los lípidos y el DNA, lo que conduce a la apoptosis de la célula diana (la proteína HSP70 aumenta el estrés oxidativo) (Yahamoto *et al.*, 2001) e infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* (Das *et al.*, 2001).

MICB es también ampliamente expresado en tumores como: carcinomas de riñón, pulmón, mama, ovario, próstata y colon, así como, en lesiones de melanoma cutáneo (Seliger *et al.*, 2003).

La función de MICB es alertar al sistema inmune del posible daño de algunas células, por medio de la interacción con el NKG2D (Figura 6), un receptor activador transmembrana que contiene residuos transmembranales cargados que le permiten la interacción con la molécula adaptadora (DAP 10) para mediar la actividad celular (Hü *et al.*, 2003, Burgess 2008, Wu *et al.*, 1999, Bauer *et al.*, 1999), se expresa de forma constitutiva en la superficie de células del sistema inmune tanto innato (células *Natural killer* “NK” y linfocitos T $\gamma\delta$ ), como del adaptativo (linfocitos T CD8+) (González *et al.*, 2006, Kulski *et al.*, 2002).

Estudios *in vitro* han demostrado que la interacción del receptor NKG2D con MICB, expresado en la superficie de células tumorales, estimula la respuesta citolítica de las células NK y los linfocitos T $\gamma\delta$  de forma independiente a la presentación antigénica (Vetter *et al.*, 2002). Con la producción de citocinas como: INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  sobre la superficie de la célula dañada, causando la lisis o apoptosis de esta (Kubin *et al.*, 2001).

Además de las moléculas MIC el receptor NKG2D también reconoce a las moléculas ULBP (*UL16 Binding Protein*) (Raulet *et al.*, 2003). La familia ULBP, formada por ULBP1, ULBP2 y ULBP3, son las últimas moléculas MHC de clase I descritas en humanos (Cosman *et al.*, 2001). Las ULBPs se descubrieron al ser identificadas junto al gen MICB como posibles ligandos de la glicoproteína UL16 del citomegalovirus humano (HCMV) en células infectadas por HCMV. UL16 es capaz de interactuar con ULBP1, ULBP2 y MICB, pero no se une a ULBP3 ni a MICA. Las moléculas ULBPs interactúan con el complejo NKG2D/DAP10 de la superficie de las células NK provocando la activación de los linfocitos NK: proliferación, citotoxicidad, producción de citocinas (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IFN $\gamma$  y GM-CSF) e incremento de la expresión de proteínas de superficie (Kubin *et al.*, 2001).



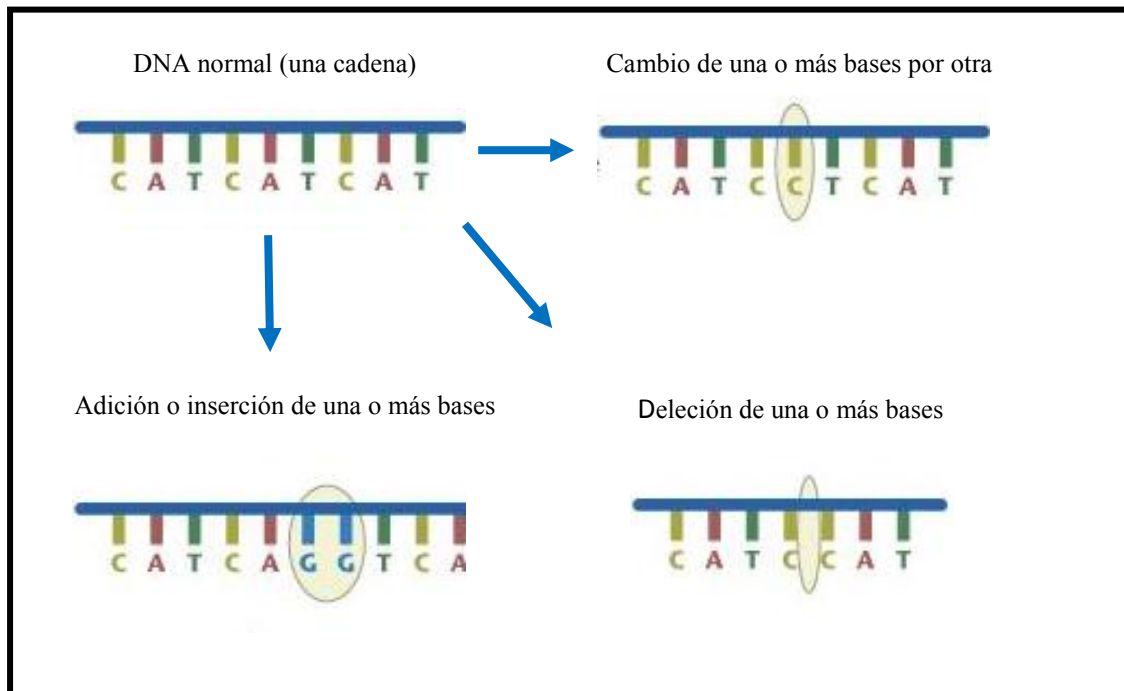
**Figura 6:** Estructura tridimensional del receptor NKG2D.

Tomado de Li *et al.*, 2001.

#### 4.1.5. Polimorfismo de genes MIC

En genética, una mutación es un cambio en la secuencia del DNA. Existen varios tipos de mutaciones (Figura 7):

- a) *Sinónima*: Se produce la sustitución de un nucleótido por otro, generando un codón distinto, que no produce cambio del aminoácido.
- b) *No sinónima*: Es la sustitución de un nucleótido por otro, generando un codón distinto, que produce cambio del aminoácido.
- c) *Delección*: Es una mutación en la que se presenta pérdida de uno o varios nucleótidos en la secuencia.
- d) *Inserción*: Mutación que tiene lugar cuando se adiciona uno o más nucleótidos en la secuencia (Fuentes *et al.*, 1998).



**Figura 7:** Muestra tres tipos de mutaciones.

Tomado de Fuentes *et al.*, 1998.

La utilización de métodos moleculares en la determinación alélica de los genes del MHC, representa avances en la sensibilidad para identificar variaciones de secuencias, es por ello que actualmente se han adoptado cada vez con mayor aceptación técnicas de DNA para el análisis de estos genes (Bonet y Martínez 2004). Como se ha mencionado

MICA y MICB son moléculas altamente polimórficas (Bahram *et al.*, 1994, Bahram y Spies 1996b), y a pesar del hecho de que MICB tiene la misma estructura y función que MICA, ha sido menos estudiado ya que su grado de polimorfismo parece ser menor.

A la fecha se tiene el registro de 64 alelos para MICA que codifican 54 proteínas y 30 alelos para MICB sintetizando 19 proteínas. (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/base de datos de secuencia stats.html>). Existen diversos estudios sobre el polimorfismo de los genes MICB, los cuales han revelado que los sitios polimórficos se encuentran principalmente en la región extracelular (Holmes *et al.*, 2002), para los cuales se han identificado un total de 18 sustituciones nucleotídicas, 4 sinónimas y 12 no sinónimas, siendo no sinónimas 6 en  $\alpha 1$ , 3 en  $\alpha 2$  y 5 en  $\alpha 3$  (Ando *et al.*, 1997. (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/base de datos de secuencia stats.html>)). Como se muestra en la tabla 1.

| POSICIÓN DEL NUCLEÓTIDO            | CODÓN      |          | AMINOÁCIDO |      |
|------------------------------------|------------|----------|------------|------|
|                                    | Referencia | Mutación |            |      |
| <b>MICB - Exón 2 (Alpha1)</b>      |            |          |            |      |
| 16                                 | GAA        | → GGA    | Glu →      | Gly  |
| 45                                 | CCC        | → CAC    | Pro →      | His  |
| 52                                 | GAT        | → AAT    | Asp →      | Asn  |
| 57                                 | AAG        | → GAG    | Lys →      | Glu  |
| 65                                 | GAC        | → GGC    | Asp →      | Gly  |
| 78                                 | ACT        | → ACC    | Thr →      | Thr  |
| 82                                 | GAC        | → GGC    | Asp →      | Gly  |
| <b>MICB - Exón 3 (Alpha2)</b>      |            |          |            |      |
| 98                                 | ATC        | → ATG    | Ile →      | Met  |
| 113                                | GAT        | → AAT    | Asp →      | Asn  |
| 170                                | CGA        | → TGA    | Arg →      | Stop |
| <b>MICB - Exón 4 (Alpha3)</b>      |            |          |            |      |
| 189                                | ACC        | → ATC    | Thr →      | Ile  |
| 192                                | GAG        | → AAG    | Glu →      | Lys  |
| 210                                | CGG        | → CGA    | Arg →      | Arg  |
| 243                                | ACC        | → ACG    | Thr →      | Thr  |
| 256                                | AGG        | → AAG    | Arg →      | Lys  |
| 267                                | CAC        | → CAT    | His →      | His  |
| 268                                | GGC        | → AGC    | Gly →      | Ser  |
| <b>MICB-Exón 5 (Transmembrana)</b> |            |          |            |      |
| 277                                | GTG        | → GCG    | Val →      | Ala  |

**Tabla 1:** Codones polimórficos del gen MICB.

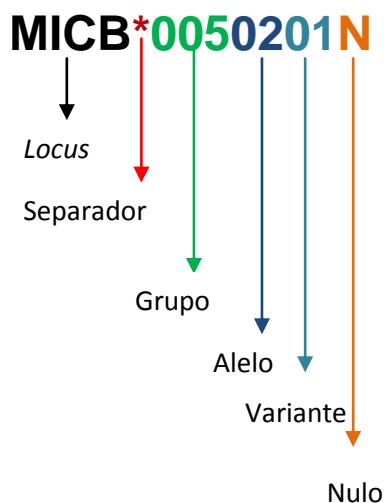
#### 4.1.6. Nomenclatura de genes MIC

Cuando se encuentra un gen nuevo dentro del sistema HLA se procede a estudiar sus variantes génicas. Los grupos de investigadores le dan el nombre que consideren más adecuado al alelo encontrado. Sin embargo, se puede dar a la misma variante génica distintos nombres. En la tabla 2 se muestra un ejemplo, de los distintos nombres que fueron asignados al alelo MICB\*00502.

| AUTOR           | Ando <i>et al.</i> , 1997 | Visser <i>et al.</i> , 1998 | Pellet <i>et al.</i> , 1997 | WHO        |
|-----------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|
| Nombre asignado | MICB01021                 | MICB-003                    | MICB004                     | MICB*00502 |

**Tabla 2:** Distintos nombres asignados al alelo MIBC\*00502.

Para evitar que una misma variante génica tenga diferente nombre, el comité de nomenclatura de la WHO (*World Health Organization*) es la encargada de nombrar a los alelos de los genes que se van descubriendo, en base a la secuencia de nucleótidos. A continuación se muestra un ejemplo, del nombramiento de los genes MIC:



- **MICB**: Indica el *locus*.
- **\***: Separador, indica que ha sido secuenciado.
- **Tres primeros dígitos**: Grupo al que pertenece.
- **Siguientes dos dígitos**: Alelo específico.
- **Subsiguientes dos dígitos**: Sugiere una variante del alelo específico.
- **N**: Indica un alelo nulo.

#### 4.1.7. Alelos de genes MIC

Los genes MIC han resultado ser altamente polimórficos. Inicialmente, mediante secuenciación de líneas celulares homocigotas, se identificaron 16 variantes alélicas para MICA y 5 para MICB (Bahram *et al.*, 1994, Bahram y Spies 1996b, Fodil *et al.*, 1996). Posteriormente se registraron 33 alelos para MICA (Visser *et al.*, 1999, Yao *et al.*, 1999) y 11 para MICB (Ando *et al.*, 1997). A la fecha se tiene el registro de 64 alelos para MICA y 30 para MICB (<http://hla.alleles.org/classo.html>. 2010). En las tablas 3 y 4 se encuentran listados los alelos de MICA y MICB respectivamente, conocidos a la fecha.

| MICA       |            |          |
|------------|------------|----------|
| MICA*001   | MICA*01802 | MICA*046 |
| MICA*00201 | MICA*019   | MICA*047 |
| MICA*00202 | MICA*020   | MICA*048 |
| MICA*00203 | MICA*022   | MICA*049 |
| MICA*004   | MICA*023   | MICA*050 |
| MICA*005   | MICA*024   | MICA*051 |
| MICA*006   | MICA*025   | MICA*052 |
| MICA*00701 | MICA*026   | MICA*053 |
| MICA*00702 | MICA*027   | MICA*054 |
| MICA*00703 | MICA*028   | MICA*055 |
| MICA*00801 | MICA*029   | MICA*056 |
| MICA*00802 | MICA*030   | MICA*057 |
| MICA*00803 | MICA*031   | MICA*058 |
| MICA*00804 | MICA*032   | MICA*059 |
| MICA*00901 | MICA*033   |          |
| MICA*00902 | MICA*034   |          |
| MICA*010   | MICA*035   |          |
| MICA*011   | MICA*036   |          |
| MICA*01201 | MICA*037   |          |
| MICA*01202 | MICA*038   |          |
| MICA*01203 | MICA*039   |          |
| MICA*013   | MICA*040   |          |
| MICA*014   | MICA*041   |          |
| MICA*015   | MICA*042   |          |
| MICA*016   | MICA*043   |          |
| MICA*017   | MICA*044   |          |
| MICA*01801 | MICA*045   |          |

**Tabla 3:** Alelos identificados del gen MICA

Tomado de: Anthony nolan: <http://hla.alleles.org/classo.html>. 2010.

---



---

| <b>MICB</b>  |           |
|--------------|-----------|
| MICB*001     | MICB*007  |
| MICB*0020101 | MICB*008  |
| MICB*0020102 | MICB*009N |
| MICB*003     | MICB*010  |
| MICB*0040101 | MICB*011  |
| MICB*0040102 | MICB*012  |
| MICB*0050101 | MICB*013  |
| MICB*0050201 | MICB*014  |
| MICB*0050202 | MICB*015  |
| MICB*0050203 | MICB*016  |
| MICB*0050204 | MICB*018  |
| MICB*00503   | MICB*019  |
| MICB*00504   | MICB*020  |
| MICB*00505   | MICB*021N |
| MICB*006     | MICB*022  |

---



---

**Tabla 4:** Alelos identificados del gen MICB.

Tomado de: Anthony nolan: <http://hla.alleles.org/classo.html>. 2010.

#### 4.1.8. Diferencias entre MICA y MICB

Los genes MICA y MICB están estrechamente relacionados, MICA codifica para un transcrito de 1382 pares de bases (pb) y MICB de 2376 pb ambos con una región abierta de lectura (ORF) de 1149 pb, que da origen a un polipéptido de 383 aminoácido (a.a.) 43Kd, sin embargo el mRNA para MICB es más largo debido a su región 3'UT. (Bahram *et al.*, 1994).

La organización genómica de dichos genes es muy similar y completamente diferente a los demás genes de la clase I (Bahram y Spies 1996a). Ambos cuentan con un intrón largo de 6840 pb para MICA y 7352 pb para MICB que separa los dos primeros exones. Además tienen un sexto exón de 302 pb para MICA y 1338 pb para MICB, que codifica la cola citoplasmática y la secuencia 3' UT no traducida. La presencia de 3'UT en la secuencia es responsable de la diferencia de aproximadamente 1Kb entre los transcritos de MICA y MICB. (Bahram *et al.*, 1994, Bahram y Spies 1996b). Como es de esperarse el alto grado de similitud se extiende a lo largo de los dos genes. Comparando individualmente los exones e intrones de MICB con su contraparte en MICA se demuestra una similitud de 80% para el exón 1, 52% para intrón 1, 91% para exón 2, 86% para intrón 2, 90% para exón 3, 87% para intrón 3, 98 % para exón 4, 97% para intrón 4, 73% para exón 5, 83% para intrón 5 y finalmente 82% para exón 6. (Bahram Spies 1996b). De esta manera MICA y MICB tienen el 83 % de residuos de aminoácidos idénticos (Bahram *et al.*, 1996). Debido a la similitud del 93% entre ambas moléculas (Bahram *et al.*, 1996) podría pensarse que estas presentarían los mismos sitios polimórficos, sin embargo, esto solo ocurre en la posición 256 en el dominio  $\alpha_3$ , los demás polimorfismos del gen MICB, se presentan en diferentes posiciones a las del gen MICA (Stephens 2001).

Estudios realizados a las secuencias de MICA y MICB han encontrado que algunas variaciones en los residuos que forman parte de la estructura como la sustitución de triptófano (MICB) por leucina (MICA) en la posición 146 puede afectar la estabilidad de esta alterando el empaquetamiento de Tyr 157 contra el núcleo hidrofóbico de la proteína; así como, la sustitución de arginina (MICB) por glutamina (MICA) en la posición 108 puede afectar su fuerza de unión. Las posiciones de las sustituciones es bastante uniforme en toda la superficie del dominio, aunque se agrupan un poco hacia el



dominio  $\alpha 2$  en MICA y aun lado de la hélice en plataforma en MICB. Las sustituciones alélicas observadas en las posiciones 52, 57, 82, 98, y 113 no afectan de manera significativa la estructura de la MICB ni su interacción con NKG2D, mientras que las sustituciones en las posiciones 16 y 45 podría resultar en cambios en la estructura de MICB, pero se encuentran lo suficientemente distantes de los residuos de NKG2D que no afectan su unión (Holmes *et al.*, 2002).

Por otra parte el gen MICB exhibe un microsatélite polimórfico dentro del intrón uno, es decir una repetición nucleotídica (CA / TG)<sub>n</sub>, dando lugar a diferentes alelos, los cuales, han sido descritos como MICB-CA14 a MICB-CA28 (kimura *et al.*, 1998). Mientras que MICA presenta un microsatélite en el exón 5 exhibiendo un número variable de repeticiones del trinucleótido GCT, dando origen a cuatro, cinco, seis, nueve y diez residuos de alanina, a dichas variaciones alélicas se les denomina A4, A5, A6, A9 y A10 respectivamente. (Collins *et al.*, 2004), la variable (A5.1) del alelo A5 presenta la inserción de un nucleótido (GGCT) originando un codón de paro (TAA) perdiendo así la región transmembranal de MICA y generando una molécula soluble (Mizuki *et al.*, 1997b).

#### **4.1.9. Estudio del polimorfismo de MICB en diferentes poblaciones**

Los recientes avances en genética molecular han permitido explorar la variabilidad directamente en el DNA, logrando así el desarrollo de poderosos sistemas de tipificación que han revolucionado no sólo la medicina, sino también otros campos de la biología. (Armour *et al.*, 1992).

Se han realizado diversos estudios del polimorfismo de MICB en líneas homocigotas y heterocigotas, sin embargo, son pocos los estudios poblacionales; Como ya se ha mencionado, el gen MICB es altamente polimórfico, lo que implica que existen grandes variaciones en la expresión de MICB entre los diferentes individuos que componen una población. A pesar de la variedad de métodos disponibles para analizar el polimorfismo de este gen, en la actualidad existe poca información referente a las frecuencias con que se presentan los diversos alelos del gene MIC en diferentes poblaciones (Stephens 2001). Sin embargo, se han realizado estudios sobre la distribución alélica de este gene principalmente en caucásicos (Españoles), donde se ha reportado que el alelo más frecuente en la población es el alelo MICB\*00502 (González *et al.*, 2003, López-Arbesu *et al.*, 2007, Rodríguez-Rodero *et al.*, 2006). En la tabla 5 se muestra la distribución y frecuencia alélica del gen MICB en diferentes poblaciones.

| POBLACIÓN ESTUDIADA               | MICB REPORTADO | WHO        | FRECUENCIA (%) | REFERENCIA                            |
|-----------------------------------|----------------|------------|----------------|---------------------------------------|
| Caucásica (Españoles)             | 01021          | (*00502)   | 46             | González <i>et al.</i> , 2003         |
|                                   | 01022          | (*00503)   | 4.5            |                                       |
|                                   | 0103101        | (*0020101) | 13.5           |                                       |
|                                   | 0103102        | (*0020102) | 3.5            |                                       |
|                                   | 0104           | (*00401)   | 13.5           |                                       |
|                                   | 0105           | (*003)     | 3.5            |                                       |
|                                   | 0106           | (*008)     | 12.5           |                                       |
| Caucásica (Españoles)             | *00201         |            | 26.6           | López- Arbesu <i>et al.</i> ,2007     |
|                                   | *003           |            | 8.4            |                                       |
|                                   | *00401         |            | 23.3           |                                       |
|                                   | *00502         |            | 72.0           |                                       |
|                                   | *00503         |            | 11             |                                       |
|                                   | *008           |            | 20.7           |                                       |
| Asiática (Noroeste de Tailandia ) | *00502         |            | 31             | Jumnainsong <i>et al.</i> , 2008      |
|                                   | *002/007       |            | 29,5           |                                       |
|                                   | *00401         |            | 11.5           |                                       |
|                                   | *008           |            | 8.5            |                                       |
|                                   | *014           |            | 3.5            |                                       |
|                                   | *00503         |            | 3              |                                       |
|                                   | *013           |            | 2              |                                       |
|                                   | *003           |            | 0.5            |                                       |
| Caucásica (Españoles)             | *00502         |            | 67.52          | Rodríguez-Rodero <i>et al.</i> , 2006 |
|                                   | *00 201        |            | 23.9           |                                       |
|                                   | *004           |            | 27.3           |                                       |
|                                   | *008           |            | 22.2           |                                       |
|                                   | *003           |            | 5.9            |                                       |
| Orientales (chinos)               | 0102           | (*00502)   | 44.4           | Li <i>et al.</i> , 1999               |
|                                   | 0103           | (*00201)   | 12.4           |                                       |
|                                   | 0104           | (*00401)   | 16.9           |                                       |
|                                   | 0105           | (*003)     | 10.1           |                                       |
|                                   | 0106           | (*008)     | 8.9            |                                       |
|                                   | 0107N          | (*009N)    | 7.3            |                                       |
|                                   |                |            |                |                                       |
| Brasileña                         | *00503         |            | 38.10          | Pino 2008                             |
|                                   | *00201         |            | 19.20          |                                       |
|                                   | *019           |            | 16.9           |                                       |
|                                   | *003           |            | 7.0            |                                       |
|                                   | *001           |            | 7.0            |                                       |
|                                   | *011           |            | 6.0            |                                       |
|                                   | *008           |            | 11.0           |                                       |
|                                   | *007           |            | 1.9            |                                       |

**Tabla 5:** Frecuencias alélicas del gen MICB en diferentes poblaciones.

#### **4.1.10. Asociación de alelos MICB con diferentes enfermedades**

MICB es una molécula extremadamente polimórfica (Bahram *et al.*, 1994). Sin embargo, no se conoce el papel que ejercen la mayoría de estos polimorfismos sobre la molécula, pero en algunos casos se ha descrito que estos polimorfismos afectan su expresión y su capacidad de activación de las células citotóxicas del sistema inmune (Caillat-Zucman *et al.*, 2006).

El sistema inmune siempre tiene que mantener un equilibrio entre destruir lo extraño o dañino y respetar lo propio. Podría pensarse que los polimorfismos que aumenten la expresión o la capacidad de activación de MICB sean responsables de una respuesta inmune más intensa, lo que probablemente sería beneficioso para eliminar más eficazmente las células infectadas por patógenos o que han experimentado una transformación tumoral, pero una respuesta más intensa podría favorecer el desarrollo de respuestas autoinmunes. En relación con estas ideas, se han descrito diversos polimorfismos de MICB que se asocian con un incremento en el riesgo de desarrollo de determinadas patologías autoinmunes como la Enfermedad Celíaca, Diabetes mellitus insulino dependiente o Artritis Reumatoide, entre otras (Caillat-Zucman *et al.*, 2006).

En la tabla 6 se muestra la asociación de algunos alelos del gen MICB con diversas enfermedades que han sido estudiados hasta el momento.

| ENFERMEDAD                              | ALELO ASOCIADO      | Pc         | ASOCIACIÓN | POBLACIÓN                         | REFERENCIA                            |
|---|---------------------|------------|------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Artritis Reumatoide                     | MICB*004            | 0.01       | Positiva   | Caucásica (Españoles)             | López -Arbesu <i>et al.</i> , 2007    |
| Cáncer Cervical                         | MICB*00502          | 0-0009     | Negativa   | Asiática (Noroeste de Tailandia ) | Jumnainsong <i>et al.</i> , 2008      |
| Enfermedad Celiaca                      | MICB*002            | <0.0001    | Positiva   | Caucásica (Españoles)             | Rodríguez-Rodero <i>et al.</i> , 2006 |
|   | MICB*008            | <0.0001    | Positiva   |                                   |                                       |
|   | MICB*00502 (DMO.2)  | 0.015      | Negativa   |                                   |                                       |
| Tumores malignos de cáncer ginecológico | MICBs               | 0.028      | Positiva   | Caucásica (Alemanes)              | Holdenrieder <i>et al.</i> , 2006     |
| Enfermedad Celiaca                      | MICB*106 (MICB*008) | <0.000001  | Positiva   | Caucásica (Españoles)             | González <i>et al.</i> , 2004         |
| Colitis Ulcerativa                      | MICB-CA18           | 0.024      | Positiva   | Orientales (Chinos)               | Lü <i>et al.</i> , 2006               |
|   | MICB0106 (MICB*008) | <0.001     | Positiva   | Orientales (Chinos)               | Li <i>et al.</i> , 2009               |
| Cáncer colon rectal                     | MICB-CA14           | 0.045      | Positiva   | Caucásica (Alemanes)              | Kopp <i>et al.</i> , 2009             |
|   | MICB-CA21           | 0.047      | Positiva   |                                   |                                       |
| Lepra Paucibacilar                      | MICB-CA16           | 0,033      | Positiva   | Asiáticos (Sur de india)          | Tosh <i>et al.</i> , 2006             |
|   | MICB-CA19           | 0.019      | Positiva   |                                   |                                       |
|   | MICB-CA21           | <0.001     | Negativa   |                                   |                                       |
|   | MICB-CA22           | 0.006      | Negativa   |                                   |                                       |
| Diabetes tipo 1                         | MICB*005            | 0.03       | Positiva   | Caucásica (Europeos)              | Field <i>et al.</i> , 2008            |
| Esclerosis múltiple                     | MICB*004            | <0.001     | Positiva   | Caucásica (Españoles)             | Fernández-Morera <i>et al.</i> , 2008 |
| Tumores malignos de cáncer de pulmón    | MICBs               | 0.022      | Positiva   | Caucásica (Alemanes)              | Holdenrieder <i>et al.</i> , 2006     |
| Colangitis Esclerosa                    | MICB-CA24           | <0.0000001 | Positiva   | Caucásica (Noruegos)              | Wiencke <i>et al.</i> , 2001          |
| Enfermedad de Addison Autoinmune        | MICB-CA25           | 0.047      | Positiva   | Caucásica (Italianos)             | Gambelunghe <i>et al.</i> , 1999      |
|   | MICB-CA17           | 0.03       | Negativa   |                                   |                                       |

**Asociación Positiva:** Riesgo de enfermedad; **Asociación negativa:** Protección a la enfermedad; **Pc:** P corregida por el numero de comparaciones.

**Tabla 6:** Asociación de alelos del gen MICB con diferentes enfermedades.

## 5. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios sobre la función de MICA, su polimorfismo y asociación con enfermedades se han realizado en los últimos años, y a pesar de que comparte un alto grado de similitud con el gen MICB, este ha sido menos estudiado; recientemente se ha descrito que MICB es altamente polimórfico y a la fecha se tiene el registro de 30 variantes alélicas, lo que implica la existencia de grandes variaciones en cuanto a la expresión de MICB entre diferentes poblaciones. La tipificación de este gen es de gran interés, puesto que, estudios realizados en otras poblaciones han encontrado asociación entre algunas variaciones nucleotídicas que presenta MICB con la susceptibilidad o resistencia a padecer ciertas patologías. Sin embargo, existe poca información con respecto a la frecuencia de estos alelos en diferentes grupos étnicos; por lo que este trabajo tuvo por objetivo realizar un estudio polimórfico de los exones 2 al 5 del gen MICB en una población mestiza e indígena (Mayas, Tarahumaras y Huicholes) Mexicana, con el fin de tipificar y establecer la frecuencia con que se presentan las diferentes variantes alélicas de dicho gen en la población estudiada. Esto se realizó empleando la técnica molecular denominada SSOP (*Sequence Specific Oligonucleotide Probe*).

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general:**

Llevar a cabo la tipificación del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana, empleando sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP).

### **6.2. Objetivo específico:**

- Analizar el polimorfismo de los exones 2 al 5 del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana.
- Determinar las frecuencias alélicas del gen MICB en la población estudiada.
- Determinar las frecuencias genotípicas del gen MICB en la población estudiada.

## **7. HIPÓTESIS.**

Estudios realizados en diversas poblaciones han mostrado que el gen MICB es altamente polimórfico y que la distribución y frecuencia de determinados alelos esta asociada con el origen de cada población, por lo que, al analizar el polimorfismo del gen MICB en individuos sanos, no relacionados, de una población mestiza e indígena Mexicana, se logrará la tipificación y por consiguiente se determinara la frecuencia con la que expresan los diferentes alelos en la población estudiada.



## 8. MÉTODO

### 8.1. Población en estudio

El estudio incluyó un total de 315 muestras de individuos sanos, no relacionados entre sí, de las cuales 190 pertenecen a población mestiza y 125 a individuos de origen indígena (43 mayas, 68 Tarahumaras y 14 Huicholes) Mexicana.

Se considera que una persona es de origen mestizo Mexicano, cuando esta ha nacido en México, siendo descendiente de habitantes nativos de la región y de individuos principalmente españoles de origen caucásico y/o negros quienes llegaron a América en el siglo XVI (Vargas *et al.*, 2002, De leo *et al.*, 1997). En este estudio se consideró como mestizo mexicano, aquellos individuos con dos generaciones previas de origen mestizo).

### 8.2. Material biológico:

Muestras de DNA genómico obtenido a partir de sangre periférica tratada con EDTA como anticoagulante.

### 8.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:

#### i). Inclusión:

##### Mestizos:

- Individuos de descendencia mestiza Mexicana (con dos generaciones previas de origen mestizo).
- Ambos sexos.
- Individuos mayores de 18 años.
- Personas sanas.
- Sujetos sin antecedentes de familiares que presentaran enfermedades asociadas al sistema HLA.
- Personas que no tuvieran familiares que padecieran de cáncer.

### Indígenas:

- Individuos Mexicanos, de origen indígena: Mayas, Tarahumaras y Huicholes, (Con dos generaciones previas de origen indígena).
- Individuo cuyos padres y abuelos fueran de origen indígena.
- Personas que hablaran su lengua nativa.
- Ambos sexos.
- Sujetos mayores de 18 años.
- Personas sanas.
- Individuos sin antecedentes de familiares que presentaran enfermedades asociadas al sistema HLA.

### **ii). Exclusión:**

#### Mestizos:

- Individuos no Mexicanos.
- Personas que no fueran de origen mestizo Mexicano.
- Individuos menores de 18 años.
- Sujetos enfermos.
- Personas con familiares que padecieran enfermedades relacionadas al sistema HLA.

#### Indígenas:

- Individuos no mexicanos.
- Personas de origen indígena diferente a población: Mayas, Tarahumaras y Huicholes.
- Individuo cuyos padres, no fueran nativos de la región y /o alguno de los dos pertenecieran a descendencia mestiza.
- Sujetos que no hablaran la lengua indígena de la región.
- Personas menores de 18 años.
- Individuos que presentaran alguna enfermedad.
- Personas que tuvieran familiares que padecieran enfermedades relacionadas al sistema HLA.

### **iii). Eliminación:**

- Muestra de sangre insuficiente.
- Muestras en las que no se obtuviera DNA de buena calidad.
- Muestras que no amplificaran por medio de la PCR.
- Muestras que mostraran resultados insuficientes.

### **8.4. Extracción y cuantificación de DNA**

La extracción de DNA se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica mediante la técnica de *salting out* de Miller (Técnica de perclorato de sodio), la cual, se basa en la lisis inicial de los eritrocitos mediante solución hipotónica y la lisis total de las células y sus estructuras subcelulares mediante el empleo de detergentes, con la posterior eliminación de las proteínas mediante precipitación salina y finalmente extracción del DNA con solventes orgánicos (Miller *et al.*, 1988).

El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm utilizando una dilución 1:50 y su calidad se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en Buffer TBE (Tris/Borato/EDTA) 0.5X.

### **8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) fue descrita por primera vez en los años ochentas por Kary Mullis. El fundamento de la PCR consiste en la multiplicación *in vitro* de un fragmento de DNA, y se basa en el principio de complementariedad de bases del DNA y la participación de la enzima polimerasa que permite la extensión del fragmento a amplificar agregando nucleótidos a la secuencia complementaria al DNA molde por medio de un proceso cíclico que comprende tres pasos los cuales son: desnaturalización, hibridación y extensión. Cada una de las moléculas de DNA hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Obteniendo así millones de copias de una molécula de DNA (Rodríguez y Barrera 2004)

Para llevarla a cabo se preparó la mezcla de reacción colocando en un tubo Eppendorf: 14.5 µl agua, 2.5 µl Buffer 10x, 0.7µl dntp's 12.5mmol, 1 µl MgCl<sub>2</sub> 2pmol, 0.5 µl *Primer 5'* a 25pmol, 0.5 µl *Primer 3'* a 25pmol, 0.55 µl Taq polimerasa 5u/ µl, obteniendo un volumen final de 20 µl. Posteriormente esta mezcla fue colocada en un tubo para PCR y se agregó el DNA a amplificar (5 mL a una concentración de 50ng/ µl); finalmente el tubo fue colocado en el termociclador y se introdujo el programa ELT el cual contiene la información de los ciclos para la amplificación del gen MICB (exón 2 al 5). La amplificación del gen se examinó mediante electroforesis. Se obteniendo un producto de PCR de 2,307pb.

Los *primers* específicos para la amplificación del exón 2 al 5 del gen MICB (Fischer *et al.*, 2000) se muestran en la tabla 7:

| <i>PRIMER</i> | <i>ORIENTACIÓN</i> | <i>LOCALIZACIÓN</i> | <i>SECUENCIA</i>          |
|---------------|--------------------|---------------------|---------------------------|
| 5'MICB Ex2-5  | Sentido            | Intrón 1 7090-7115  | AAGACCTTCCTTCCAACACTGCCTT |
| 3'MICB Ex2-5  | Antisentido        | Intrón 5 9373-9396  | GAAAGCTCCTTTCTAGGCAGTAG   |

**Tabla 7:** Localización de los *primers* utilizados en la amplificación del exón 2 al 5 del gen MICB.

Tomado de Fischer *et al.*, 2000.

## 8.6. Electroforesis en gel de agarosa

El DNA es un polímero polianiónico cargado negativamente debido a la presencia de grupos fosfato, por lo que migra cuando es sometido a un campo eléctrico. Los geles de agarosa se utilizan para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA pequeños, estos pasan fácilmente a través de los poros y se desplazan rápidamente, mientras que los fragmentos mayores avanzan con más lentitud. La movilidad de los fragmentos depende del tamaño del DNA (número de bases) y de la concentración de agarosa del gel. Las características del gel se escogen según la longitud media de los fragmentos de DNA que se deseen separar (Sambrook *et al.*, 1989). Los productos de PCR obtenidos

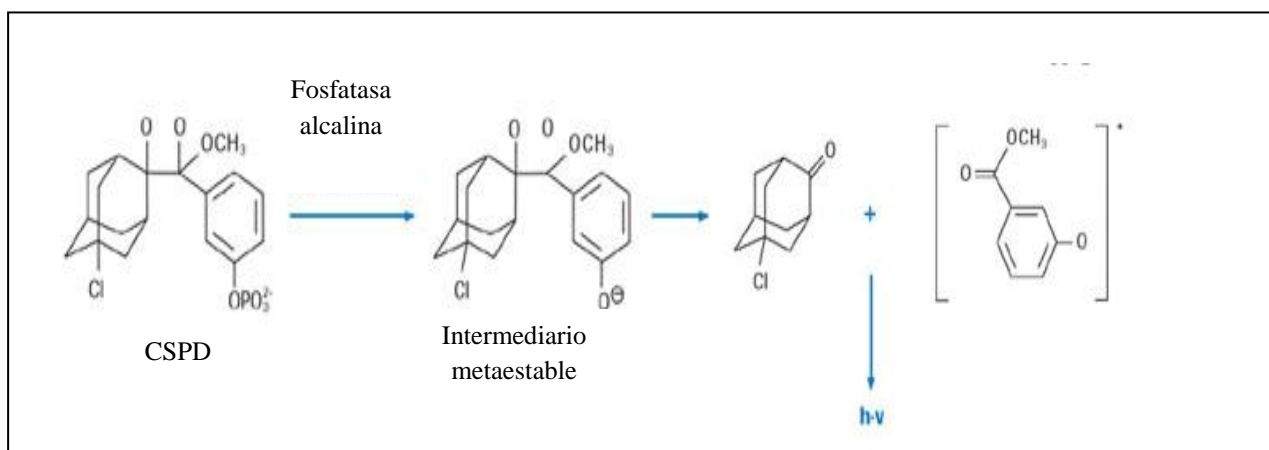
fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio en amortiguador TBE 0.5X.

### 8.7. Técnica de SSOP (*Sequence Specific Oligonucleotide Probe*)

El producto amplificado por PCR es inmovilizado en una membrana de *nylon* antes de la hibridación con las sondas marcadas con digoxigenina (3'DIG). Para diferenciar los alelos es necesario un grupo de sondas de secuencia específicas. El proceso de hibridación se desarrolla a una temperatura específica para cada sonda, a continuación las membranas fueron lavadas de igual manera a una temperatura óptima para cada sonda, con el fin de eliminar el exceso de esta. La detección de la hibridación de las sondas, a la secuencia complementaria amplificada por PCR se realizó mediante la adición de anticuerpos anti digoxigenina marcados con fosfatasa alcalina (ALP). La ALP utiliza CSPD como sustrato quimioluminiscente y la luz emitida es detectada por autorradiografía.

Reacción de quimioluminiscencia:

Es una reacción enzimática, la desfosforilación del CSPD por la fosfatasa alcalina conduce al anión fenolato meta estable que se descompone (figura 8) y emite luz en un máximo Longitud de onda de 477 nm. La emisión de luz luminiscente se registra en películas de rayos X (Bronstein *et al.*, 1991).



**Figura 8:** Reacción de quimioluminiscencia.

Tomado de: Bronstein *et al.*, 1991.

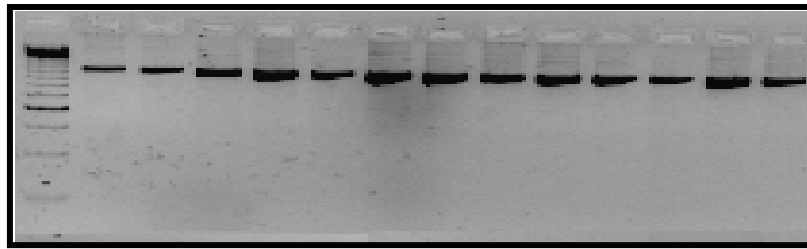
## **8.8. Interpretación de resultados y análisis estadístico**

Para asignar los alelos correspondientes a cada muestra, se realizó una comparación de los resultados obtenidos con el patrón de hibridación. Posteriormente se cálculo por conteo directo la frecuencia con que se presentaron las diversas variantes alélicas de MICB en la población estudiada.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Amplificación del gen MICB por PCR

El estudio polimórfico del gen MICB se realizó en 190 muestras de individuos pertenecientes a población mestiza, así como, en 125 sujetos indígenas (43 mayas, 68 tarahumaras y 14 huicholes) ambos de origen Mexicano. Cada una de estas muestras fue sometida a una reacción de PCR, empleando los *primers* descritos por Fischer (Fischer *et al.*, 2000) con el fin de amplificar del exón 2 al 5 del gen MICB. En la figura 9 se muestra un gel de agarosa sobre el cual fueron colocados cada uno de los productos obtenidos de la PCR, con lo cual, se verificó la amplificación del gen en estudio.



**Figura 9:** Corrimiento electroforético del gen MICB en gel de agarosa.

En cada carril se colocó una muestra diferente.

## 9.2. Tipificación alélica del gen MICB

Para estudiar los polimorfismos de MICB se empleó la técnica molecular SSOP. Por medio de este método se detectaron las variaciones nucleotídicas, que dan origen a los diferentes alelos, empleando un conjunto de 47 sondas de oligonucleótidos de secuencia específica, 42 descritas previamente (Fischer *et al.*, 2000) y 5 estandarizadas en el laboratorio de Histocompatibilidad, de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría en el CMN-SXXI del IMSS (tabla 8).

| SONDA | VARIANTE NUCLEOTÍDICA | UBICACIÓN |
|-------|-----------------------|-----------|
| 43    | A                     | Exón 2    |
| 44    | G                     | Exón 2    |
| 45    | T                     | Exón 2    |
| 46    | C                     | Exón 2    |
| 47    | A                     | Exón 4    |

**Tabla 8:** Muestra la variante nucleotídica que detectan cada una de las sondas estandarizadas en el laboratorio de de Histocompatibilidad, de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría en el CMN-SXXI del IMSS.

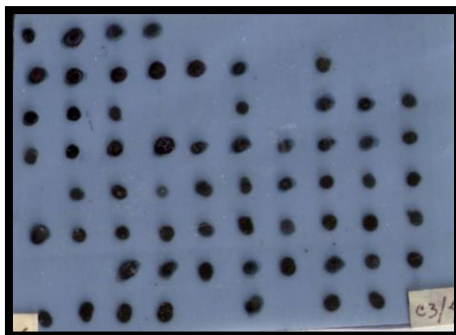
Para realizar la interpretación de los resultados se requirió el patrón de hibridación, de las sondas para cada uno de los alelos de MICB; el cual, se muestra en la tabla 9.



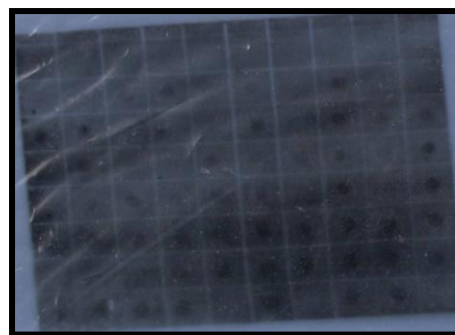


Las variaciones nucleotídicas presentes en los exones 2 al 5 del gen MICB, fueron detectadas tras la hibridación del producto amplificado y fijado a la membrana de *nylon* con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica, marcadas con digoxigenina, cuyos resultados se detectaron en placas de rayos X mediante una reacción de quimioluminiscencia.

En la figura 10 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en la técnica de SSOP. Las placas de rayos X presentadas en esta figura, reflejan el resultado obtenido tras la hibridación de las membranas con el par de sondas 21 y 22, donde, la sonda 21 detecta la variante nucleotídica *G* y la sonda 22 la *A*. En la placa “a” se observa la presencia de puntos en negro, los cuales indican un resultado positivo para el polimorfismo detectado con la sonda 21. En la placa “b” no se observan los puntos negros, lo que sugiere, un resultado negativo para el polimorfismo detectado por la sonda 22.



Placa “a”



Placa “b”

**Figura 10:** Placas de rayos X que muestran la detección de las variaciones nucleotídicas, por medio de las sondas específicas, tras una reacción de quimioluminiscencia. Cada punto de la placa es una muestra diferente.

### 9.3. Frecuencia alélica del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana

Los resultados obtenidos en la tipificación de cada una de las muestras fueron comparados con el patrón de hibridación, para asignar los alelos correspondientes. En la tabla 10 se presentan los alelos identificados y la frecuencia con que se presentaron en población mestiza e indígena Mexicana.

| Alelos identificados | Frecuencia alélica en población Mexicana |                    |
|----------------------|--|--------------------|
|                      | Mestizos<br>n=190                        | Indígenas<br>n=125 |
|                      | *2n=380                                  | *2n=250            |
| MICB*00201           | 0.003                                    | 0.084              |
| MICB*00201v          | 0  | 0.024              |
| MICB*003             | 0.016                                    | 0.012              |
| MICB*00401           | 0.026                                    | 0.024              |
| MICB*00401v          | 0.137                                    | 0.028              |
| MICB*00502/ *010     | 0.721                                    | 0.708              |
| MICB*00503           | 0.013                                    | 0.008              |
| MICB*00505           | 0.003                                    | 0                  |
| MICB*006             | 0  | 0.008              |
| MICB*006v            | 0  | 0.012              |
| MICB*008             | 0.018                                    | 0.004              |
| MICB*009N            | 0.016                                    | 0.060              |
| MICB*013             | 0  | 0.004              |
| MICB*015             | 0  | 0.008              |
| MICB*018             | 0.010                                    | 0.016              |
| MICB*019             | 0.010                                    | 0                  |
| MICB*020             | 0.005                                    | 0                  |
| MICB*022             | 0.021                                    | 0                  |
| <b>Total:</b>        | 1  | 1                  |

\*: Numero de alelos

**Tabla 10:** Distribución de la frecuencia alélicas en población mestiza e indígena Mexicana.

En la siguiente tabla se muestra la distribución alélica del gen MIB en individuos de origen Mayas, Tarahumaras y Huicholes, agrupados en el grupo de indígenas en el presente estudio (tabla 11).

| <b>Frecuencia alélica en población indígena</b> |                                    |   |  |
|---|------------------------------------|---|--|
| <b>Alelos identificados</b>                     | <b>Mayas<br/>n = 43<br/>*2n=86</b> | <b>Tarahumaras<br/>n = 68<br/>*2n=136</b> | <b>Huicholes<br/>n = 14<br/>*2n=28</b> |
| MICB*00201                                      | 0.011                              | 0.132                                     | 0.071                                  |
| MICB*00201v                                     | 0.034                              | 0.007                                     | 0.107                                  |
| MICB*003  | 0                                  | 0.022                                     | 0                                      |
| MICB*00401                                      | 0                                  | 0.030                                     | 0                                      |
| MICB*00401v                                     | 0.069                              | 0.007                                     | 0.035                                  |
| MICB*00502/ *010                                | 0.825                              | 0.632                                     | 0.71                                   |
| MICB*00503                                      | 0                                  | 0.014                                     | 0                                      |
| MICB*006  | 0                                  | 0.022                                     | 0                                      |
| MICB*006v                                       | 0                                  | 0.007                                     | 0.035                                  |
| MICB*008  | 0                                  | 0   | 0.035                                  |
| MICB*009N                                       | 0.023                              | 0.095                                     | 0                                      |
| MICB*013  | 0.011                              | 0   | 0                                      |
| MICB*015  | 0                                  | 0.014                                     | 0                                      |
| MICB*018  | 0.023                              | 0.014                                     | 0                                      |
| <b>Total</b>                                    | <b>1</b>                           | <b>1</b>                                  | <b>1</b>                               |

**Tabla 11:** Distribución alélica del gen MICB en población maya, tarahumara y huicholes.

#### 9.4. Distribución alélica del gen MICB en Mexicanos comprara con otras poblaciones

En la siguiente tabla se muestra una comparación de la frecuencia alélica del gen MICB en población Mexicana con otras poblaciones reportadas previamente.

| Alelo<br>MICB* | Frecuencia alélica en diferentes poblaciones |                                   |   |  |   |                                  |
|----------------|--|-----------------------------------|---|--|---|----------------------------------|
|                | Mexicana<br>(mestizos)<br>2n=380             | Mexicana<br>(indígenas)<br>2n=250 | <sup>1</sup> Españoles<br>(Caucásica)<br>2n=200 | <sup>2</sup> Asiática<br>(Noroeste Tailandia )<br>2n=200 | <sup>3</sup> Orientales<br>(chinos)<br>2n=426 | <sup>4</sup> Brasileña<br>2n=130 |
| 001            | 0  | 0                                 | 0   | 0  | 0   | 0.070                            |
| 00201          | 0.003  | 0.084                             | 0.135   | 0  | 0   | 0.192                            |
| 00201v         | 0  | 0.024                             | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 003            | 0.016  | 0.012                             | 0.035   | 0.005  | 0.101   | 0.070                            |
| 00401          | 0.026  | 0.024                             | 0.125   | 0.115  | 0.169   | 0                                |
| 00401v         | 0.137  | 0.028                             | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 00502/ 010     | 0.721  | 0.708                             | 0.460   | 0.310  | 0.444   | 0                                |
| 00503          | 0.013  | 0.008                             | 0.045   | 0.030  | 0   | 0.381                            |
| 00505          | 0.003  | 0                                 | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 006            | 0  | 0.008                             | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 006v           | 0  | 0.012                             | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 007            | 0  | 0                                 | 0   | 0  | 0.124   | 0.008                            |
| 008            | 0.018  | 0.004                             | 0.125   | 0.085  | 0.089   | 0.110                            |
| 009N           | 0.016  | 0.060                             | 0   | 0  | 0.073   | 0                                |
| 013            | 0  | 0.004                             | 0   | 0.020  | 0   | 0                                |
| 014            | 0  | 0                                 | 0   | 0.035  | 0   | 0                                |
| 015            | 0  | 0.008                             | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 018            | 0.010  | 0.016                             | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 019            | 0.010  | 0                                 | 0   | 0  | 0   | 0.169                            |
| 020            | 0.005  | 0                                 | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 022            | 0.021  | 0                                 | 0   | 0  | 0   | 0                                |
| 00201/ 007     | 0  | 0                                 | 0   | 0.295  | 0   | 0                                |

<sup>1</sup> Gonzales *et al.*, 2003; <sup>2</sup> Jumnainsong *et al.*, 2008; <sup>3</sup> Li *et al.*, 1999; <sup>4</sup> Pinho Patricia 2008.

**Tabla 12:** Frecuencias alélicas del gen MICB encontradas en Mexicanos, comparadas con otras poblaciones.

### 9.5. Frecuencia genotípica del gen MICB en población mestiza e indígena Mexicana.

Los resultados obtenidos en la tipificación alélica del gen MICB en la población estudiada, permitieron determinar también la frecuencia genotípica, lo cual, se muestra en la siguiente tabla 13.

| GENOTIPO<br>MICB*- MICB* |            | Frecuencia en población Mexicana |                               |
|--------------------------|------------|----------------------------------|-------------------------------|
|                          |            | Mestizos<br>n=190<br>*2n=380     | Indígenas<br>n=125<br>*2n=250 |
| 00201                    | 00502/ 010 | 0.005                            | 0.128                         |
| 00201                    | 00401v     | 0                                | 0.008                         |
| 00201                    | 006v       | 0                                | 0.008                         |
| 00201                    | 009N       | 0                                | 0.024                         |
| 00201v                   | 00502/ 010 | 0                                | 0.050                         |
| 003                      | 00502/ 010 | 0.030                            | 0.024                         |
| 003                      | 00401      | 0.005                            | 0                             |
| 00401                    | 00401      | 0.015                            | 0                             |
| 00401                    | 00502/ 010 | 0.052                            | 0.016                         |
| 00401v                   | 00502/ 010 | 0.157                            | 0.032                         |
| 00401                    | 006        | 0                                | 0.008                         |
| 00401v                   | 006        | 0                                | 0.008                         |
| 00401                    | 006v       | 0                                | 0.008                         |
| 00401                    | 00503      | 0.005                            | 0                             |
| 00401                    | 008        | 0.005                            | 0                             |
| 00401                    | 009N       | 0.010                            | 0                             |
| 00401                    | 018        | 0.005                            | 0                             |
| 00401                    | 019        | 0.010                            | 0                             |
| 00401                    | 022        | 0.042                            | 0                             |
| 00401                    | 013        | 0                                | 0.008                         |
| 00401                    | 0015       | 0                                | 0.008                         |
| 00502/ 010               | 00502/ 010 | 0.570                            | 0.504                         |
| 00502/ 010               | 006        | 0                                | 0.008                         |
| 00502/ 010               | 008        | 0.015                            | 0.008                         |
| 00502/ 010               | 009N       | 0.010                            | 0.090                         |
| 00502/ 010               | 018        | 0.005                            | 0.032                         |
| 00502/ 010               | 019        | 0.010                            | 0                             |
| 00502/ 010               | 020        | 0.010                            | 0                             |
| 00503                    | 00502/ 010 | 0.010                            | 0.016                         |
| 00503                    | 00505      | 0.005                            | 0                             |
| 00503                    | 009N       | 0.005                            | 0                             |
| 008                      | 008        | 0.005                            | 0                             |
| 008                      | 009        | 0.005                            | 0                             |
| 018                      | 018        | 0.005                            | 0                             |

\*Numero de genotipos

**Tabla 13:** Distribución de la frecuencia genotípica encontrada en población mestiza e indígena Mexicana.

## 10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la tipificación del gen MICB revelaron que de los 30 alelos conocidos a la fecha, 12 fueron encontrados en población mestiza: *MICB\*00201*, *MICB\*003*, *MICB\*00401*, *MICB\*00502/ MICB\*010*, *MICB\*0503*, *MICB\*00505*, *MICB\*008*, *MICB\*009N*, *MICB\*0018*, *MICB\*0019*, *MICB\*020*, *MICB\*022*. Así como, en individuos de origen indígena se identificaron 14 alelos: *MICB\*00201*, *MICB\*00201v*, *MICB\*003*, *MICB\*00401*, *MICB\*00401v*, *MICB\*00502/ MICB\*010*, *MICB\*0503*, *MICB\*006*, *MICB\*006v*, *MICB\*008*, *MICB\*009N*, *MICB\*0013*, *MICB\*0015*, *MICB\*0018* (tabla 10). Comparando la distribución alélica entre mestizos e indígenas, se observa que los alelos más frecuentes en ambas poblaciones son *MICB\*00502/\*010* (0.721 y 0.708), *MICB\*00401v* (0.137 y 0.028) y *MICB\*009N* (0.016 y 0.060) respectivamente. Una diferencia notable entre estos grupos, esta dada por el alelo *MICB\*00201*, el cual, presentó mayor expresión en indígenas (0.084) que en mestizos (0.003), lo contrario sucedió con el alelo *MICB\*008* que originó una mayor expresión en mestizos (0.018) que en indígenas (0.004). Por otra parte, se observó que los alelos *MICB\*00505*, *MICB\*019*, *MICB\*020*, *MICB\*022* se encuentran presentes en mestizos pero no en indígenas, mientras que, *MICB\*00201v*, *MICB\*006*, *MICB\*006v*, *MICB\*013*, *MICB\*015* se expresaron en indígenas, pero están ausentes en mestizos (tabla 10). Con lo que respecta al resto de los alelos, estos no fueron detectados, lo que sugiere que su expresión es muy rara en nuestra población.

El alelo con mayor incidencia fue el *MICB\*00502/ \*010*, el cual, no se logró definir debido a que la variación nucleotídica que marca la diferencia entre ambos alelos se encuentra en el exón 6, región que no fue amplificadas, ya que el estudio se basó en un trabajo previo realizado por Fischer y colaboradores, donde refieren que en los exones 2 al 5 se encuentran las regiones polimórficas (Fischer *et al.*, 2000), por lo que los *primers* utilizados fueron diseñados para amplificar únicamente esta región. Para definir este alelo, se analizaron las muestras con los *primer* específicos para esta mutación. Esperando encontrar una mayor frecuencia del alelo *MICB\*00502*, como ha sido reportado en estudios previos realizados en población caucásica (Españoles) (Gonzales *et al.*, 2003, Arbesu *et al.*, 2007, Rodero *et al.*, 2006).

Los alelos *MICB\*00201* y *MICB\*00401* mostraron una variante alélica definida como *MICB\*00201v* y *MICB\*00401v*, donde “v” significa variante (Fischer *et al.*,



2000) al originar un resultado inesperado. *MICB\*00201* con la sonda 32 presentó un resultado positivo (intrón 2) y *MICB\*00401* con la sonda 38 situada en el intrón 4, esto debido a la posible sustitución nucleotídica de G por A en la posición 7759 para *MICB\*00201v* y una inserción TGGG en la posición 91251 para *MICB\*00401v*, tal como lo reporta Fischer en líneas celulares linfoblastoides B (Fischer *et al.*, 2000b).

Los datos obtenidos en la tipificación del gen *MICB* en población se asemejan a los reportados para otras poblaciones. Un estudio realizado por González y col. en población caucásica (Españoles) encontró a *MIB\*00502* como el alelo más frecuente, así mismo, los alelos *MICB\*00201* y *MICB\*00401* también se encontraron ampliamente expresados en esta población (González *et al.*, 2003), sin embargo, una diferencia notable, es que este autor no refiere la expresión *MICB\*009N*, *MICB\*0018*, *MICB\*019* y *MICB\*022* alelos que fueron encontrados en la población en estudio. Por otra parte Li y col. en un estudio realizado en individuos orientales (chinos), también encontró a *MICB\*00502* como el alelo más frecuente, así mismo, reporta la expresión de *MICB\*00401*, *MICB\*003*, *MICB\*008*, *MICB\*009N* (Li *et al.*, 1999). Jumnainsong y col. tipificaron a un grupo de individuos Asiáticos, encontrando *MICB\*00502* y *MICB\*002/\*007* como los alelos más frecuentes (Jumnainsong *et al.*, 2008). En contraste con lo reportado por estos investigadores, un estudio realizado en brasileños reporto *MICB\*00503* como el alelo más frecuente, seguido de *MICB\*00201* y *MICB\*019*, así mismo, encontraron la expresión de los alelos *MICB\*001* y *MICB\*011* (Pinho P. 2008), los cuales no fueron detectados en nuestra población (tabla 12).

Los genotipos más frecuentes encontrados en nuestro estudio, tanto en mestizos como en indígenas fueron *MICB\*00502/\*010-MICB\*00502/\*010* (0.568 y 0.504), seguidos de *MICB\*00401v-MICB\*00502* (0.157 y 0.032) y *MICB\*00502/\*10-MICB\*009N* (0.010 y 0.088). En particular, en población mestiza el genotipo *MICB\*00401v-MICB\*022* (0.042) también se expreso periódicamente. Así como, en indígenas el *MICB\*00201-MICB\*00502/\*10* (0.128) se expreso ampliamente. El resto de los genotipos expresados en ambas poblaciones fueron variados, por lo que, presentaron frecuencias relativamente bajas (tabla 13).

La amplificación de fragmentos de DNA para el estudio de genes polimórficos mediante PCR, ha añadido sensibilidad a la genotipificación HLA. Los métodos más empleados



son las técnicas moleculares denominadas SSP y la SSOP, en el primer caso, se realizan diversas reacciones de PCR para cada *locus* utilizando en cada una de ellas un conjunto de *primers*, en número variable, cuyas secuencias discriminan las diferentes variantes que puede presentar el *locus*, de forma tal que sólo se produce reacción de amplificación cuando el DNA contiene el alelo que corresponde al grupo de *primers* (Bonet y Martínez 2004). Debido al elevado polimorfismo del HLA, es necesario el empleo de un gran número de pares de *primers*, con el fin de obtener una resolución aceptable en la asignación de alelos a la muestra, en consecuencia este método no resulta práctico para el análisis simultáneo de un gran número de muestras. En cambio, el método de SSOP que incluye la amplificación del DNA a estudiar y su unión a un soporte sólido; con la posterior hibridación de la secuencia amplificada empleando sondas de oligonucleótidos de secuencia específica, marcadas con digoxigenina y detectándose por quimioluminiscencia, permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras. (Bonet y Martínez 2004).

## 11. CONCLUSIÓN

Por medio de la técnica molecular PCR-SSOP se logró la tipificación alélica del gen MICB en población Mexicana, encontrando a *MICB\*00502/\*010* (0.721 y 0.708), como el alelo más frecuente, seguido de los alelos *MICB\*00401v* (0.137 y 0.028), *MICB\*009N* (0.016 y 0.060) y *MICB\*00401* (0.026 y 0.024). En particular en el grupo de mestizos el alelo *MICB\*022* (0.021) también fue ampliamente expresado, así como, *MICB\*00201* (0.084) en los indígenas. Dichos resultados se asemejan a los reportados previamente para otras poblaciones. En lo referente a la frecuencia genotípica, se observó que la población presenta una mayor expresión para el homocigoto *MICB\*00502/\*010-MICB\*00502/\*010* (0.568 y 0.504), así como, para los heterocigotos *MICB\*00401v-MICB\*00502/\*10* (0.157 y 0.032) y *MICB\*00502/\*10-MICB\*009N* (0.010y 0.088). *MICB\*00401v-MICB\*22* (0.042) también se expresó con elevada frecuencia en mestizos, así como, *MICB\*00201-MICB\*00502/\*10* (0.128) en los indígenas.

## 12. SUGERENCIAS

Se considera que para tener una mayor precisión de la distribución alélica del gen MICB en población mexicana, se debe realizar el estudio del exón 6, para definir el alelo en las muestras que fueron tipificadas como *MICB\*00502/\*010*, Así como, realizar la tipificación de este gen en otros grupos de individuos mexicanos. Dichos resultados muestran la diversidad genética de la población y son útiles como referencia para estudios a futuro donde se investigó la asociación de los polimorfismos de *MICB* con determinadas patologías.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**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.

**Armour J.A.L.** y Jeffreys A.J. *Biology and applications of human minisatellite loci*. Curr. Opin. Genet. Dev.1992;2:850-56.

**Azimi N**, Jacobson S, Tanaka Y, Corey L, Groh V, Spies T. *Immunostimulation by induced expression of NKG2D and its MIC ligands in HTLV-1 associated neurologic disease*. Immunogenetics.2006;58:252.

**Bahram S**, Bresnahan M, Geraghty D, and Spies T. *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes*. Proc Natl Acad Sci USA.1994;91:6259-63.

**Bahram S** and Spies T. The MIC gene family. Non polymorphic antigen presentation molecules. Res. Immuno.1996a;147:328-32.

**Bahram S** and Spies T. *Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA*. Immunogenetics.1996b;43:230-33.

**Bahram S**, Mizuki N, Inoko H, Spies T. *Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene*. Immunogenetics.1996a;44:80-81.

**Bahram S**, Shiina T, Oka A, Tamiya G, and Inoko H. *Genomic structure of the human MHC class I MICB gene*. Immunogenetics.1996b;45:161-62.

**Bahram S**. *MIC genes: from genetics to biology*. Adv. in Immunol.2000;76:1-60.

**Bauer S**, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips J, Lanier L, Spies T. *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress- inducible MICA*. Science.1999;285:727-29.

**Bonet L** y Martínez Z. Los métodos serológicos y moleculares en la tipificación de los antígenos leucocitarios humanos. Mini revisión Bioquímica. Asociación Mexicana de Bioquímica clínica.2004;29:126-30.

**Bronstein I**, Voyta J, Olesen C. *Novel chemiluminescent adamantyl 1,2-dioxetane enzyme substrates in: Stanley P. and Kricka L. J. (eds.), Bioluminescence and Chemiluminescence, Current Status*.1991:73-82.

**Burgess S.J.** Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan J E. *The NKG2D receptor: immunobiology and clinical*. Implications Immunol Res.2008;40:18–34.

**Caillat-Zucman S.** *How NKG2D ligands trigger autoimmunity?* Hum. Immunol. 2006;67:204-7.

**Collins Robert W. M.,** Henry A. F. Stephens, Michael A. Clare, and Robert W. Vaughan. *High Resolution Molecular Phototyping of MICA and MICB Alleles Using Sequence Specific Primers*. Hum. Immunol.2002;63:783–94.

**Cosman D,** Mullberg J, Sutherland C, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny N. *ULBPs, novel MHC class I related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. Immunity.2001;14:123–33.

**Das H,** Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita C.T, Spies T, and Bukowski J.F. *MICA engagement by human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function*. Immunity.2001;15:83-93.

**De Leo C,** Castelan N, Lopez M, Gonzalez N, Weckmann AL, Melin-Aldana H, Vargas-Alarcon G, Bordes J, Alarcon-Segovia D, Granados J, Ramirez E, Lisker R. *HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican mestizos established from serological typing of 50 families*. Hum Biol.1997;69(6):809-18.

**Fernández-Morera, L.** Rodrigo, Lopez-Vazquez A, Rodero S.R, Martinez- Borra J, Nino P, Gonzalez S, Lopez-Larrea C, *MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis*. Hum. Immunol.2003;64:816–22.

**Field S.F,** Nejentsev S, Walker N.M, Howson J.M, Godfrey L.M, Jolley J.D, Hardy M.P.A, Todd J.A. *Sequencing-Based Genotyping and Association Analysis of the MICA and MICB Genes in Type 1 Diabetes*. Diabetes.2008;57:1753–56.

**Fischer G,** Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh S, 7 Paul J. Travers PJ. Madrigal JA. *Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B*. Immunogenetics.2000;51:591–99.

**Fischer G,** Pérez-Rodríguez M, Argüello JR, Cox ST, McWhinnie A, Travers PJ, Madrigal JA. *Three novel MICB alleles*. Tissue Antigens.2000b;55:166-70.

**Fodil N,** Laloux L, Wanner V. Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, and Bahram S. *Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene*. Immunogenetics.1996;44:351-57.

**Fuentes Arderiu,** Queraltó Compañó J M. *Bioquímica clínica y patología molecular*. 1998.2<sup>a</sup> ed. Ed. Reverté. Barcelona.

**Gambelunghe G**, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi CB. *Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease*. J Clin Endocrinology Metabolism. 1999;84(10):3701-07.

**Gaudieri S K** Giles, J.K. Kulski, and R.L. Dawkins.. Duplication and polymorphism in the MHC: Alu generated diversity and polymorphism within the PERB11 gene family. Hereditas. 1997;127:37-46.

**González S**, Groh V, Spies T. *Immunobiology of human NKG2D and its ligands*. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;298:121-38.

**González S**, Rodrigo L, López A, Fuentes D, Agudo L, Rodriguez S, Fernandez J, Martinez J, López C, *Association of MHC class I related gene B (MICB) to celiac disease*. American Journal of Gastroenterology. 2004; 99: 676-80.

**González S**, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Rodrigo L, López-Larrea C. *MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers*. Immunogenetics. 2003; 54:850-55.

**Groh V**, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996;93:12445-50.

**Groh V**, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein K, Spies T. *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999;96:6879-84.

**Günther E**, Walter L. *The major histocompatibility complex of the rat (Rattus norvegicus)*. Immunol. 2001;53:520-42.

**Güssow D**, Rein R, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann G, Kottman A, Ploegh HL. *The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit*. Immunol. 1987;139(9): 3132-38.

<http://imgt.cines.fr> <http://hla.alleles.org/classo.html>. 2010.

<http://imgt.cines.fr>.

<http://mhc-x.u-strasbg.fr/human.htm>

<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/lists/otherlist.html>.

[http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/base de datos de secuencia stats.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/base%20de%20datos%20de%20secuencia%20stats.html)

**Holdenrieder S**, Stieber P, Peterfi , Nagel D, Steinle A, Salih H.R. *Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA*. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2006; 55(12): 1584-89.

**Holmes M, Li P, Petersdorf E, Strong R.** *Structural studies of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D.* J Immunol.2002;169(3):1395-1400.

**Hu S, Monteiro R, Berrih-Aknin S, Zucman S.** *Potential Role of NKG2D/MHC Class I-Related Chain A Interaction in Intrathymic Maturation of Single-Positive CD8T Cells.* J Immunol.2003;171:1909–17.

**Jordan B.R, Caillol D, Damotte M, Delovitch T, Ferrier P, Kahn-Perles B, Kourilsky F, Layet C, Le Bouteiller P, Lemonnier F.A.** *HLA class I genes: from structure to expression, serology and function.* Immunol.1985;84:73-92.

**Jumnainsong A, Jearanaikoon P, Khahmahpahte S, Wongsena W, Romphruk A, Chumworathayi B, Vaeteewoottacharn K, Ponglikitmongkol M, Romphruk A, Leelayuwat C.** *Associations of MICB with cervical cancer in north-eastern Thais:identification of major histocompatibility complex class I chain-related gene B motifs influencing natural killer cell activation.* Clin Experimental Immunol.2008;153:205-13.

**Kimura T, Goto K, Yabuki K, Mizuki N, Tamiya G, Sato M, Kimura M, Inoko H, Ohno S.** *Microsatellite polymorphism within the MICB Gene Among Japanese patients with Behcets Disease.* Hum. Immunol.1998;59:500–502.

**Kopp R, Glas J, Lau-Werner U, Albert E, Weiss E.** *Association of MICA-TM and MICB C1\_2\_A Microsatellite Polymorphisms with Tumor Progression in Patients with Colorectal Cancer.* J Clin Immunol.2009;29:545-54.

**Kubin M, Cassiano L, Chalupny J, Chin W, Cosman D, Fanslow W, Mullberg J, Rousseau A.M, Ulrich D, and Armitage R.** *ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells.* Eur. J. Immunol.2001;31:1428-37.

**Kulski J, Dunn D, Hui J, Martinez P, Romphruk A, Leelayuwat C, Tay G, Oka A, Inoko H,** *Alu polymorphism within the MICB gene and association with HLA-B alleles.* Immunogenetics.2002;53:975-79.

**Kumanovics A, Madan A, Qin S, Rowen L, Hood L, Fischer-Lindahl K.** *QUOD ERAT FACIENDUM: Sequence analysis of the H2D and H2Q regions of 129/SvJ mice.* Immunogenetics.2002;54:479-89.

**Leelayuwat C. et al.** *A new polymorphic and multicopy MHC gene family related tononmammalian class I.* Immunogenetics. 1994; 40: 339–51.

**Li Y, Xia B, Lü M, Ge L, Zhang X.** *MICB0106 gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in central China.* Int J Colorectal Dis.2009;25:153-59.

**Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, Strong RK.** *Crystal Structure of the MHC Class I Homolog MIC-A, a gd T Cell Ligand.* Immunity. 1999;10:577–84.

**Li P, Morris DL, Willcox B.E, Steinle A, Spies T, Strong R.K.** *Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA.* Nat. Immunol.2001;2:443–51.

**López-Arbesu R, Ballina-García F.J, Alperi-López M, López-Soto S, Rodríguez-Rodero J, Martínez-Borra A, López-Vázquez J.L, Fernández-Morera J.L, Riestra-Noriega R, Queiro-Silva A, Quiñones-Lombraña C, López-Larrea, González S.** *MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility.* Rheumatology.2007;46(3):426-430.

**Lû Min, Xia B, Li J, Ye M, Zhang X, Tan Q,** *MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population.* Clin Immunol.2006;120:199-204.

**Malissen M, Malissen B, Jordan B.R.** *Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(3):893-7.

**Mendoza-Rincón J, Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh SGE, Fischer G, Madrigal J.** *Characterisation of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing.* Immunogenetics.1999;49:471–78.

**Miller S A, Dykes D D, Polesky H F.** *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* Nucleic Acids Res. 1988; 16(3): 1215.

**Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama 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 Behçet disease.* Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:1298–1303.

**Molinero L.L, Fuertes M.B, Girart M. V, Fainboim L, Rabinovich G.A, Costas M. A, Zwirner N. W.** *NF- $\kappa$ B Regulates Expression of the MHC Class I-Related Chain A Gene in Activated T Lymphocyte.* J Immunol.2004;173:5583-90.

**Pellet P, Renaud M, Fodil N, Laloux L, Inoko H, Hauptmann G, Debre P, Bahram S, Theodorou I.** *Allelic repertoire of the human MICB gene.* Immunogenetics.1997 46:434–36.

**Pinho de França Patricia.** *Polimorfismo dos genes mica e micb e o abortamento recorrente.* Tesis de maestría. Brasil: Universidade federal do Paraná;2008.

**Raulet D.H.** *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands.* Nat. Rev. Immunol.2003;3:781–90.

**Rodríguez I, Barrera H.** *La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención.* Ciencia UANL.2004;3:323-35.

**Rodríguez-Rodero S, Fdez.-Morera J, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, López-Arbesu R, López-Soto A, Segundo González, and Carlos López-Larrea.** *MHC Class I*

*Chain-Related Gene B Promoter Polymorphisms and Celiac Disease.* Hum Immunol.2006;67,208–14.

**Rueda B**, Pascual M, Lopez-Nevot M.A, Koeleman B.P, Ortega E, Maldonado J, Lopez M, Martin J. *Association of MICA-A5. 1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study.* Am. J. Gastroenterol.2003;98:359–62.

**Sambrook J**, Fritsh E, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.*1989. 2<sup>nd</sup> ed. N.Y.Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1659.

**Seliger B**, Abken H, Ferrone S. *HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity.* Immunology.2003;24 (2):82-87.

**Shiina T**, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E. *Molecular dynamics of MHC genesis unravelled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region.* Proc Natl Acad Sci USA.1999;96:13282.

**Steinle A**, Groh V, Spies T. *Diversification, expression, and gd T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1998;95:12510–515.

**Stephens H. A. et al.** Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphisms in exons 2, 3, and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens.*1999;53:167–174.

**Stephens H.A.** *MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?* Trends Immunol.2001;22:378–85.

**Tosh K**, Ravikumar M, Tzenova J, Meisner S, Hill A, Pitchappan R. *Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India.* Human Molecular Genetics. 2006; 15 (19): 2880–87.

**Vargas-Alarcón G**, Gamboa R, Vergara Y, Rodríguez- Zepeda JM, de la peña A, Izaguirre R, Zúñiga J, Ruiz Morales J. A. Granados J. *LMP2 and LMP7 Gene Polymorphisms in Mexican Populations: Mestizos and Amerindians.* Genes and Immunity.2002.3:373-77.

**Vetter C. S**, Groh V, Straten P, Spies T, Brocker E. B, and Becker J. C. *Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma.* J Invest Dermatol.2002;118:600.

**Visser C.J**, Tilanus M.G, Schaeffer V, Tatari Z, Tamouza R, Janin A,Charron D. *Sequencing-based typing reveals six novel MHC class I chain-related gene B (MICB) alleles.* Tissue Antigens.1998;51:649–52.

**Visser C.J**, Tilanus M.G, Tatari Z, Van der Zwan A.W, Bakker R, Rozemuller E.H, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D. *Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes.* Immunogenetics.1999;49:561–66.



**Wang H**, Ruan Z, Wang Y, Han J, Fu X, Zhao T, Yang D, Xu W, Yang Z, Wang L, Wu Y. *MHC class I chain-related molecules induced on monocytes by IFN- $\gamma$  promote NK cell activation* *Molecular Immunol.*2007;45:1548–56.

**Wiенcke K**, Spurkland A, Schrumpf E, Boberg K.M. *Primary Sclerosing Cholangitis IS Associated to an extended B8-DR3 Haplotype Including Particular MICA and MICB Alleles.* *Hepatology.*2001;34( 4):625-30.

**Wu J**, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.* *Science.*1999;285:730-32.

**Yamamoto K**, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H. *Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2)* *Biochim. Biophys. Acta.*2001;1526:10-12.

**Yao Z**, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert E.D. *Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing.* *Eur J Immunogenet.*1999;26:225–32.

**Zou Y**, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P. *Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A.* *J Immunol.*2005;174:3098.