



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO  
DEL GEN *KLRC4* EN CÁNCER DE MAMA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**KEVIN ROGELIO LUNA TORRES**

**MÉXICO, D.F.**

**2016**





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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: Pastelin Palacios Rodolfo**  
**VOCAL:**                           **Profesor: Coello Coutiño Martha Patricia**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: Pérez Rodríguez Martha Esthela**  
**1° SUPLENTE:**               **Profesor: Dimitrova Dinkova Tzvetanka**  
**2° SUPLENTE:**               **Profesor: Martínez Álvarez Julio César**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA, UNIDAD DE ALTA ESPECIALIDAD DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

**EL SIGUIENTE TRABAJO RECIBIÓ EL SIGUIENTE APOYO FINANCIERO:**

**SECRETARÍA DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN DEL DISTRITO FEDERAL (PICSA12-209 Y 234-2012)**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ**

**SUSTENTANTE:**

---

**KEVIN ROGELIO LUNA TORRES**

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	5
RESUMEN .....	9
INTRODUCCIÓN .....	11
Marcadores del cáncer .....	11
<i>Señalización de proliferación celular</i> .....	12
<i>Evasión de supresores de crecimiento</i> .....	13
Cáncer de mama .....	14
<i>Cáncer de mama en México</i> .....	15
<i>Factores de riesgo y etiología</i> .....	21
Células asesinas naturales (NK).....	22
<i>Subtipos de células NK</i> .....	23
<i>Receptores de células NK: reconocimiento y muerte a blancos celulares</i> .....	25
<i>Receptores tipo inmunoglobulina de la célula NK (KIR)</i> .....	27
<i>Receptores heterodiméricos tipo lectina C (CD94/NKG2)</i> .....	28
<i>Mecanismos de citotoxicidad</i> .....	29
Organización genómica de la familia NKG2 .....	30
<i>NKG2D</i> .....	32
<i>NKG2F(KLRC4)</i> .....	33
Polimorfismos de un solo nucleótido .....	35
JUSTIFICACIÓN.....	37
HIPÓTESIS .....	38
OBJETIVOS .....	39
<i>Objetivo general</i> .....	39
<i>Objetivos particulares</i> .....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
<i>Controles</i> .....	42
<i>Pacientes</i> .....	42
<i>Extracción de DNA</i> .....	42
<i>Cuantificación del DNA</i> .....	43
<i>Electroforesis horizontal</i> .....	44

<i>Preparación de las diluciones de la muestra</i> .....	44
<i>Condiciones de la PCR</i> .....	45
<i>Preparación de la mezcla de reacción</i> .....	46
<i>Preparación de la reacción en placa</i> .....	46
<i>Sondas</i> .....	48
RESULTADOS .....	50
DISCUSIÓN .....	58
CONCLUSIONES .....	62
PERSPECTIVAS .....	62
BIBLIOGRAFÍA .....	63
ANEXO 1 .....	68
ANEXO 2 .....	70

## ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA (H<sub>2</sub>O)</b>	Etilendiamino Tetraacetato dihidratado
<b>FAM</b>	Fluoróforo marcador de la sonda en el extremo 3'
<b>Fwd</b>	Orientación delantera
<b>Granzima</b>	Proteasas de serina presentes en células T CD8 citotóxicas y células NK, que participan en la inducción de la apoptosis en las células diana.
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de Granulocitos-macrófagos
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de Granulocitos
<b>HWpval</b>	Valor de p del equilibrio de Hardy Weinberg
<b>IL</b>	Interleucina: Término para referirse a las citocinas producidas por leucocitos (IL-5, IL-8 e IL-13)
<b>MAF</b>	Frecuencia del alelo menor
<b>MHC</b>	El Complejo Principal de Histocompatibilidad es una agrupación de genes que codifica un grupo de glucoproteínas de membrana llamadas moléculas MHC. Las de Clase I presentan péptidos antigénicos generados en el citosol a

células T CD8, y las moléculas de Clase II presentan péptidos antigénicos generados en vesículas intracelulares a células T CD4.

<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>NaClO<sub>4</sub></b>	Perclorato de Sodio
<b>NK</b>	Célula asesina natural ( <i>Natural Killer Cell</i> )
<b>NKG2F</b>	Receptor F del grupo 2 de NK
<b>KLRC4</b>	Receptor tipo lectina de la célula asesina Subfamilia C miembro 4
<b>KIR</b>	Receptor tipo inmunoglobulina de la célula asesina ( <i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i> )
<b>ObsHET</b>	Heterocigotos observados
<b>Ooforectomía</b>	Procedimiento quirúrgico que implica el retiro de uno o ambos ovarios de una mujer
<b>Perforina</b>	Es una proteína que puede polimerizarse para formar poros de membrana que son una parte importante en el mecanismo de muerte en la citotoxicidad mediada por células. Es producida por células T y NK citotóxicas, y se almacenan en

gránulos que la célula libera cuando entra en contacto con una célula diana específica

**PredHET**

Heterocigotos esperados

**Real time PCR**

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**Quimiocinas CC**

Quimiocinas con dos cisteínas adyacentes cerca del amino terminal (CCL3, CCL5 y CCL8)

**Quimiocinas CXC**

Quimiocinas con dos cisteínas equivalentes separados por un aminoácido único (CXCL8).

**RefSNP**

SNP de referencia (*Reference SNP*)

**rs**

Secuencia de referencia

**Rev**

Orientación reversa

**SDS**

Dodecil Sulfato de Sodio

**SNP**

Polimorfismo de un solo nucleótido (*Single nucleotide polymorphism*)

**TBE**

Buffer Tris/Borato/EDTA

**TNF- $\alpha$**

Factor de necrosis tumoral. Citocina producida por macrófagos y células T.



**VIC o FAM**

Fluoróforos reporteros de las sondas TaqMan  
ubicados en el extremo 5´

## RESUMEN

En México, el cáncer de mama es una de las neoplasias malignas más importantes por su frecuencia y su mortalidad. La frecuencia de la enfermedad es de 15.81 por cada 100,000 mujeres de 25 años o más que la padecen, por lo cual se constituye como la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres. Uno de los factores más importantes es la susceptibilidad genética individual en el riesgo de cáncer mamario.

Las células asesinas naturales (NK) son una clase de linfocitos citolíticos caracterizados por la intervención de sus funciones efectoras durante la respuesta inmune innata.

Los receptores que regulan la actividad de las células NK caen dentro de dos grandes familias que contienen varios otros receptores de superficie además de los receptores NK. Una está compuesta de receptores tipo inmunoglobulina (KIR) y otra por receptores homólogos a las lectinas tipo C que se llaman receptores parecidos a lectina asesinos (KLR).

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen KLRC4 (NKG2F) de las células asesinas naturales (NK), lo cual nos permitirá determinar si existe una asociación con cáncer de mama, así como preveer si ésta posible asociación confiere un riesgo o protección de desarrollar la enfermedad.

El diseño del estudio es de casos y controles. Para ello se parte de muestras de sangre periférica de pacientes femeninas, así como de un grupo control ambos

pertenecientes al Valle de México. Se extrae el DNA y los SNP's (rs2617170, rs2617171 y rs2246809) se amplifican por medio de la técnica de PCR en tiempo real en placas de reacción que contienen las secuencias de los SNP que se estudian.

Una vez amplificadas las secuencias se hace una base de datos donde se albergan los resultados y se ordenan por SNP de acuerdo con los criterios de análisis para posteriormente tratarlos con el programa Haploview.

Con este software se puede determinar el equilibrio de Hardy Weinberg, la frecuencia alélica y haplotípica del gen KLRC4. La frecuencia genotípica se obtuvo por conteo directo. Los SNP's cumplen el equilibrio de Hardy Weinberg: rs2617170 (0.738), rs2617171 (0.5246) y rs2246809 (0.1952).

Los alelos y genotipos más frecuentes en nuestra población son: rs2617170 (alelo C; genotipo CC) rs2617171 (alelo G; genotipo GG) y rs2246809 (alelo G; genotipo GG)

El Haplotipo más frecuente fue: GCG.

Al analizar los SNP's de las pacientes con el grupo control no se encontró ninguna asociación entre los SNP's evaluados del gen KLRC4 con la enfermedad.

# INTRODUCCIÓN

## Marcadores del cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial y uno de los factores de riesgo que participa es la susceptibilidad genética. Durante su procedimiento, se genera una transformación maligna por acumulación de alteraciones genéticas que permiten a las células adquirir capacidades biológicas durante las etapas de desarrollo del cáncer. Estos marcadores incluyen señalización de proliferación celular, evasión de supresores de crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), capacidad de replicación ilimitado, inducción de angiogénesis y activación de la invasión o metástasis. Figura 1. (1,2)

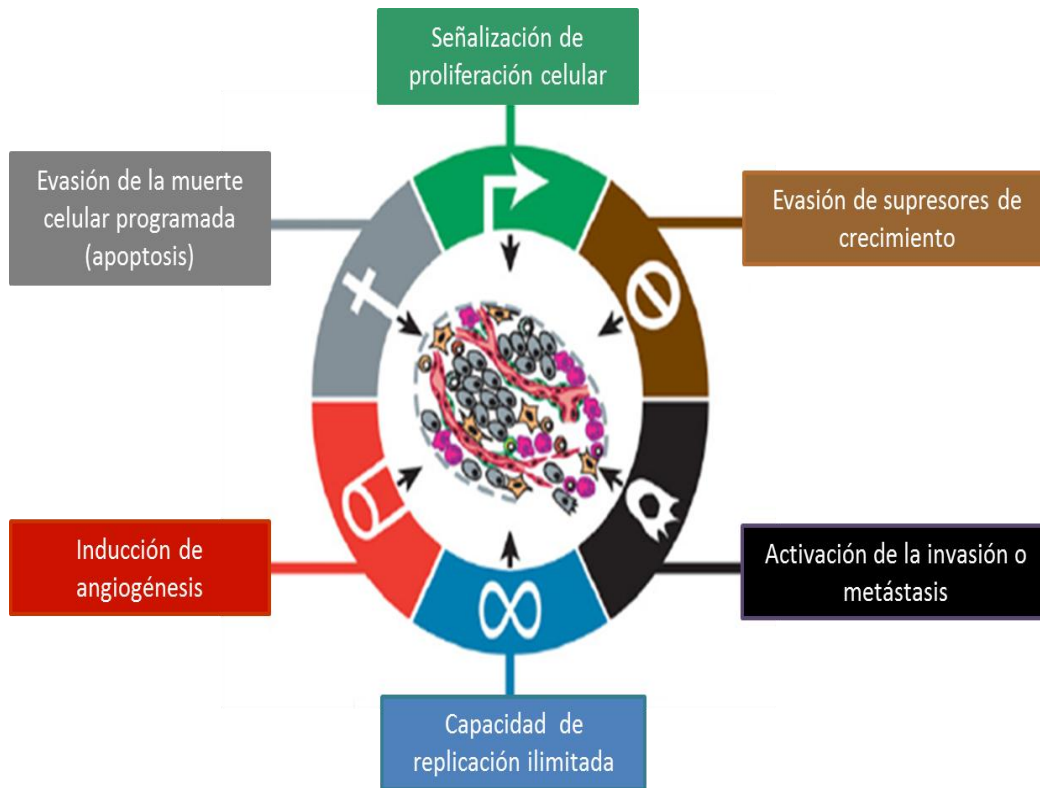


Figura 1. Marcadores del cáncer. Existen marcadores en diferentes puntos donde puede existir una alteración para que se desarrolle el cáncer

### *Señalización de proliferación celular*

Podría decirse que el rasgo más fundamental de las células del cáncer implica su capacidad para mantener la proliferación crónica. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento que indican la entrada y progresión celular a través del ciclo celular, asegurando así una homeostasis del número de células y por lo tanto el mantenimiento de la arquitectura del tejido normal y función.

### *Evasión de supresores de crecimiento*

Además de la capacidad de inducir y mantener positivamente las señales que estimulan el crecimiento, las células cancerígenas deben también burlar vías de gran alcance que regulan negativamente la proliferación celular, muchos de estas vías dependen de la actividad de genes supresores de tumores. Los dos principales genes supresores de tumores codifican la proteína asociada a retinoblastoma (RB) y a las proteínas TP53, éstas funcionan dentro de los nodos de control central, clave en los circuitos reguladores del ciclo celular que rigen las decisiones celulares para proliferar o bien activar programas de senescencia y apoptosis.

La independencia mitogénica, el incremento de la proliferación así como la evasión de la apoptosis son etapas importantes no sólo en el desarrollo de malignidad, sino también en la progresión de la enfermedad; tanto el aumento de la proliferación como la supervivencia sirven como indicadores de mal pronóstico.

(4)

## Cáncer de mama

El cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres en todo el mundo, pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos. La frecuencia de la enfermedad es de 15.81 por cada 100,000 mujeres de 25 años o más que la padecen. El cáncer mamario dejó de estar circunscrito a los países desarrollados y a mujeres con mayores recursos económicos, incluso ha desplazado al cáncer cervico uterino en varias regiones de Latinoamérica como primera causa de muerte por neoplasias malignas femeninas.(9)

Se estima que en 2004 murieron 519 000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo. (50)

La incidencia del cáncer de mama está aumentando en el mundo en desarrollo debido al incremento de la esperanza de vida, aumento de la urbanización y la adopción de modos de vida occidentales.

La incidencia varía mucho en todo el mundo, en los Estados Unidos de Norteamérica el número de casos aumentó progresivamente de 1970 a 1997 en un 161% (de 69,000 a 180,200) y el número de muertes por cáncer de mama es cerca del 50% (de 30,000 a 49,000). Cuando se analiza la tasa de incidencia ajustada a la edad, ésta muestra un incremento anual de 1% de 1940 a 1980 y a partir de ese año el incremento se aceleró a 4% anual, estabilizándose en 111.3 por 100.000 a partir de 1995. (40,41)

En los países de América Latina y Asia la mortalidad por cáncer de mama está aumentando más rápidamente, en ellos se tenían las tasas más bajas de incidencia (del 7 al 14/100000) en comparación con los que tienen las tasas más altas (17 a 27/ 100000). (11)

Con un promedio de riesgo de vida media de 8-10%, el cáncer de mama es la neoplasia maligna con mayor incidencia en las mujeres del Hemisferio Occidental. Hasta el 15% de las mujeres sanas tienen al menos un primer grado de relación con el cáncer de mama. (6)

### *Cáncer de mama en México*

En 2008, el 10.9% de los casos de cáncer en México estaban relacionados con tumores en las mamas. Este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar en prevalencia a nivel nacional y es el primero si se toma en cuenta únicamente a la población femenina en mujeres mayores de 25 años: (8)

En dos años la mortalidad por cáncer de mama en México se incrementó, de acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) y de la Secretaría de Salud (SS), al pasar de 10.8 a 16.7 decesos por cada 100 mil mujeres (2009 a 2011), y una de las razones es que 70 por ciento de los casos se detecta en etapas tardías, cuando el tumor ya se diseminó a otros órganos.



La tasa de mortalidad tuvo, según el INEGI, su nivel más alto en 2005 con 17.9 muertes por cada 100 mil mujeres, luego bajó en 2009 a 10.8 y actualmente repuntó, convirtiéndose en la primera causa de mortalidad entre mexicanas de 25 a 60 años.

Cada año se registran 13 mil 600 nuevos casos de cáncer de mama en el país, y también ahora ya se contabilizan, en ese mismo periodo, cerca de 100 hombres (antes sólo se reportaban alrededor de 20) con dicho padecimiento.

Según estudios realizados por el Consejo Nacional de Población (CONAPO), se calcula que para el año 2020 la incidencia en mujeres alcanzará los 38.8 millones, es decir, casi un tercio de la población total.

La interpretación de las tendencias de mortalidad por cáncer de mama es complicado, ya que podría ser el resultado de la combinación de los cambios en los factores de riesgo y las prácticas de detección, así como una mejor supervivencia debido a mejoras del tratamiento. Una forma de distinguir estos efectos consiste en el intento de separar los efectos de la edad, período y cohorte implicados en las tendencias a través de un modelo estadístico apropiado.

Para establecer los efectos de la edad, período y cohorte en un estudio, se obtuvieron de las bases de datos oficiales de mortalidad generadas por el INEGI el número de muertes individuales ocurridas en mujeres de México entre los años 1980 y 2005.

Entre 1980 y 2005, se observó un total de 67 854 muertes por cáncer de mama en mujeres mexicanas. Durante el período analizado, la edad media de muerte por

cáncer de mama se mantuvo muy cerca de un promedio de 57.3 años (desviación estándar = 0,38). Además, la distribución por edades de la población de mujeres mexicanas mayores de 25 años durante el período analizado también se ha mantenido cerca de una edad media de 44.7 años (desviación estándar = 0,24). La figura 2 muestra el número anual de muertes por cáncer de mama en mujeres mexicanas de 25 años o más, así como su tendencia a través de los años.

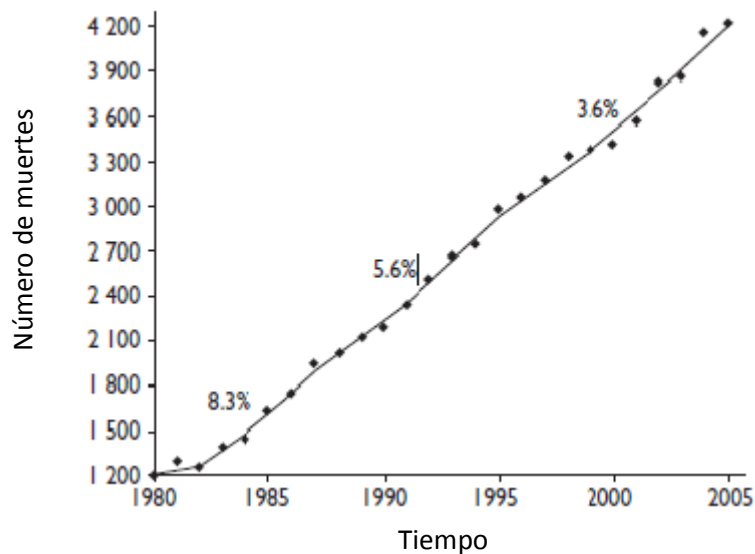


Figura 2. Muertes por cáncer de mama anuales en mujeres mexicanas de 25 años o más. Los puntos representan el número observado de muertes por cáncer de mama. Las líneas se obtuvieron utilizando regresión de Poisson. Las líneas continuas son segmentos de línea con pendientes de años significativas. La variación porcentual anual proporciona segmentos de línea significativos.

Existe un claro gradiente de aumento en las tasas de mortalidad por cáncer de mama conforme aumenta la edad, observado a lo largo del período analizado. Los

cuatro grupos de edad más jóvenes que comprenden las mujeres mexicanas de entre 25 y 74 años muestran tendencias muy similares entre 1980 y 2005.

En estos grupos de edad las tasas de mortalidad aumentaron anualmente entre 2,6 y 3,5% durante los primeros 13 a 15 años del período analizado, pero posteriormente las tasas de mortalidad muestran incrementos anuales que no son estadísticamente significativos a partir de cero. Por otro lado, las mujeres mexicanas de 75 años de edad o mayores muestran un aumento de la tasa de mortalidad anual del 4,9% entre 1980 y 1987 y un incremento del 1,2% entre 1987 y 2005. Las tendencias de las tasas de mortalidad por cáncer de mama específicas por edad para cinco grupos se muestran en la figura 3.

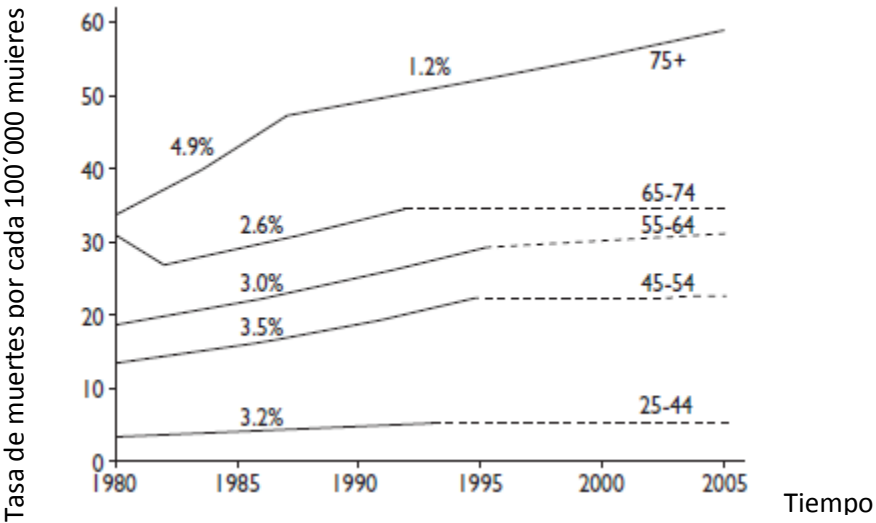


Figura 3. Las tendencias de la tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres mexicanas por grupos de edad. Las líneas se obtuvieron utilizando regresión de Poisson.

La Figura 4 presenta gráficamente la edad estimada, el período y los efectos de mortalidad por cohorte en cáncer de mama . Las tasas de mortalidad por cáncer de mama aumentan muy rápido entre 25 y 35 años de edad y continúan aumentando con la edad, aunque a tasas más bajas. El efecto de cohorte de nacimiento en las tasas de mortalidad por cáncer de mama se muestra como la tasa de razón de muerte con respecto a los cohortes de nacimiento de los años 1940-1941. Se compone de las tasas de mortalidad por cáncer de mama más altas en los cohortes más recientes de mujeres que nacen después de ese período (1940-1941), en contraste con las cohortes anteriores, las mujeres nacidas a principios del siglo 20. Las tasas de mortalidad por cáncer de mama aumentan más rápidamente en las mujeres nacidas entre 1935 y 1950 y considerablemente más lentamente en las mujeres nacidas después. Por último, como esperaban, el efecto estimado de período; también se expresa como razones de tasas de muerte, muestra una intensidad mucho menor que los efectos de la edad y de cohorte. No obstante, las tasas de mortalidad por cáncer de mama muestran un ligero aumento durante la década de 1980, una estabilización durante la primera mitad de la década de 1990 y un ligero descenso continuo después.

(11)

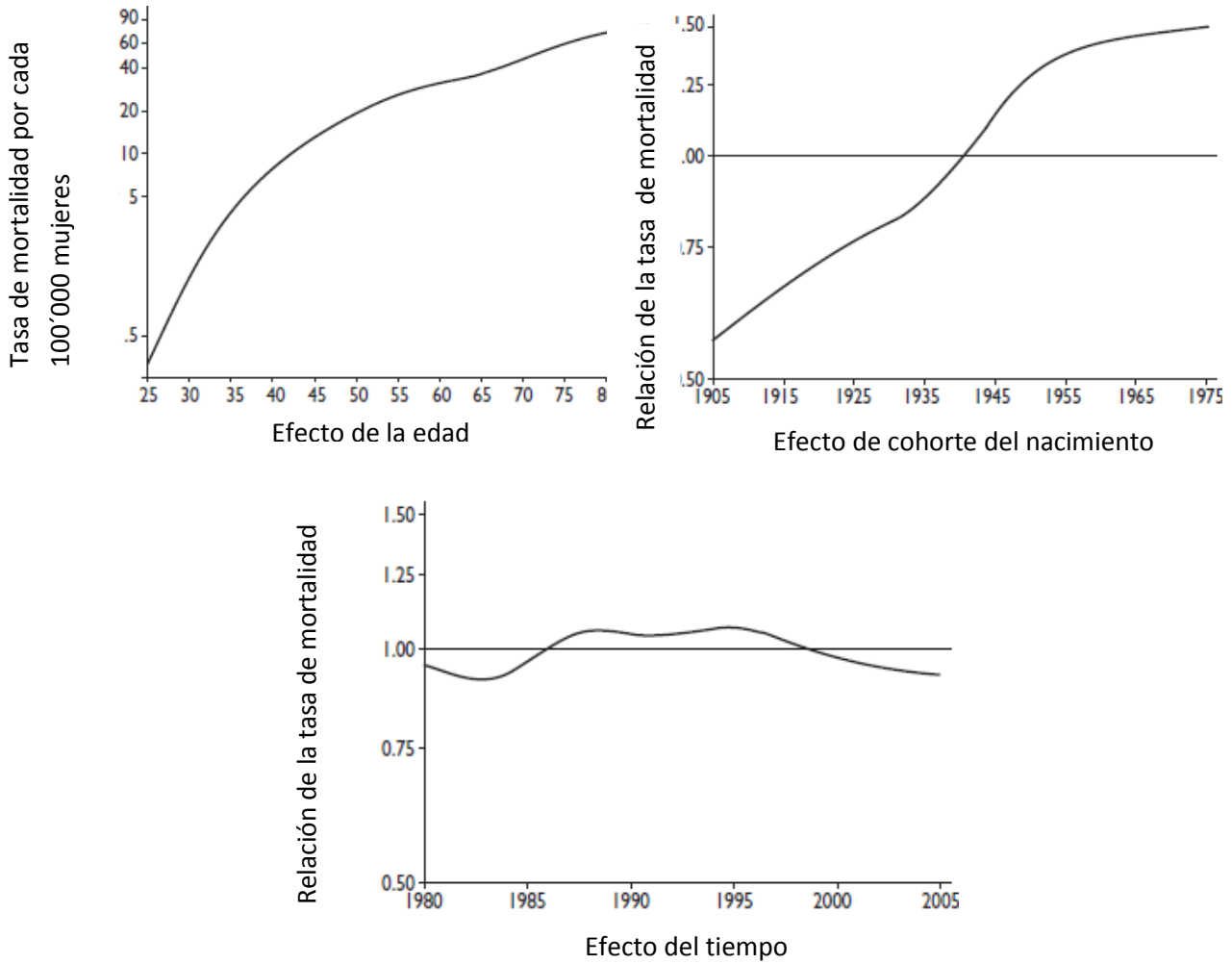


Figura 4. Los efectos de la edad, tiempo y cohorte en la mortalidad por cáncer de mama en México, utilizando el modelo edad-tiempo-cohorte de Holford. Los efectos de la edad se muestran en tasas de mortalidad por cada 100 000 personas por año para el cohorte de referencia. Los efectos de cohorte representan proporciones de la tasa de mortalidad en relación con la cohorte de referencia (1940-1941).

## *Factores de riesgo y etiología*

Se conocen bien varios factores de riesgo asociados con el cáncer de mama. Dentro de los cuales destacan las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 que confieren una alta probabilidad de riesgo de desarrollar cáncer de mama. Cerca del 80% o aproximadamente 10 veces mayor que la de la población general cuando se presentan deleciones en estos genes. (3) El riesgo varía de individuo a individuo, y parece que el riesgo ha aumentado en las últimas generaciones. Estas observaciones implican que los factores no genéticos pueden modificar el riesgo de herencia. Los factores que aparecen con mayor fuerza para modificar el riesgo son los antecedentes reproductivos y los factores hormonales.

Otros factores de cambio son la edad en la que comienza la menstruación, el embarazo, la lactancia, la nuliparidad, la ooforectomía, la obesidad, la dieta, así como el consumo de anticonceptivos orales. El efecto de la paridad es diferente en los genes BRCA1 y BRCA2. La multiparidad parece conferir un efecto protector en portadoras de la mutación en BRCA1, pero se asocia con un aumento del riesgo en BRCA2. (3,10)

Hasta el momento, ningún país ha revertido el aumento en el número de casos, lo cual indica que los factores de riesgo que lo determinan no se han modificado. (9)

## Células asesinas naturales (NK)

Las células asesinas naturales (NK) son una clase de linfocitos citolíticos granulares que no expresan receptores de antígenos de células T (TCR) o inmunoglobulinas de superficie (Ig), pero que por lo general expresan los marcadores de superficie CD16 (FcγRIII) y CD56 en humanos.

Su tamaño varía entre 50- 80 nm, exhiben una morfología distinta en comparación con otros leucocitos (Figura 5); por lo general son grandes, con núcleo en forma de riñón, presentan en su citoplasma numerosos orgánulos, muchos de los cuales son gránulos de membrana que se visualizan fácilmente por medio de la tinción histológica y microscopía de luz simple. La mayoría de los gránulos contienen moléculas efectoras líticas responsables de la actividad citotóxica de las células NK. También poseen un amplio y desarrollado retículo endoplásmico y aparato de Golgi, lo que sugiere un significativo nivel de la síntesis proteica constitutiva.

(12,17)

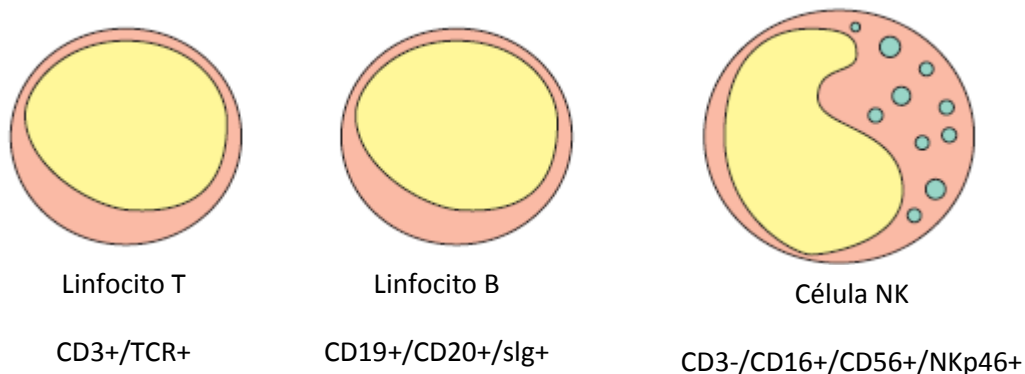


Figura 5. Los tres linajes de linfocitos. La figura representa la característica morfología de las células NK y el fenotipo que distinguen a estas células de T y Células B.

Debido a sus funciones efectoras intervienen durante la respuesta inmune innata. Pueden inducir directamente la muerte a células infectadas por virus, participar en la inmunovigilancia contra células tumorales e inducir su muerte, así como su rol en la edición de células dendríticas e influir en la respuesta de Linfocitos T cooperadores. (16)

### *Subtipos de células NK*

Se han identificado dos poblaciones distintas de células NK de acuerdo a la densidad de expresión de CD56 en su superficie celular. Aproximadamente el 90 % de las células NK expresan en baja densidad CD56 (CD56dim), pero presentan altos niveles de CD16bright; mientras que una minoría (aproximadamente 10 %) de las células expresan en alta densidad CD56 (CD56bright) y bajos niveles de CD16dim/neg.

Estas poblaciones de células NK muestran importantes diferencias en su potencial citotóxico, en la capacidad para producir citocinas, y en las respuestas por activación de citocinas.

Las células NK CD56bright son la población primaria que produce citocinas inmunorreguladoras, incluyendo interferón (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), factor estimulante de colonias granulocitos macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL-10 y IL-13). Por otro lado, la producción de citocinas por las células NK CD56dim es insignificante, incluso después de la estimulación específica con monocinas recombinantes derivadas de macrófagos. (13)



Las diferencias en el perfil de expresión del receptor y la función inmune entre las dos poblaciones de células NK maduras se muestran en la Figura 6.

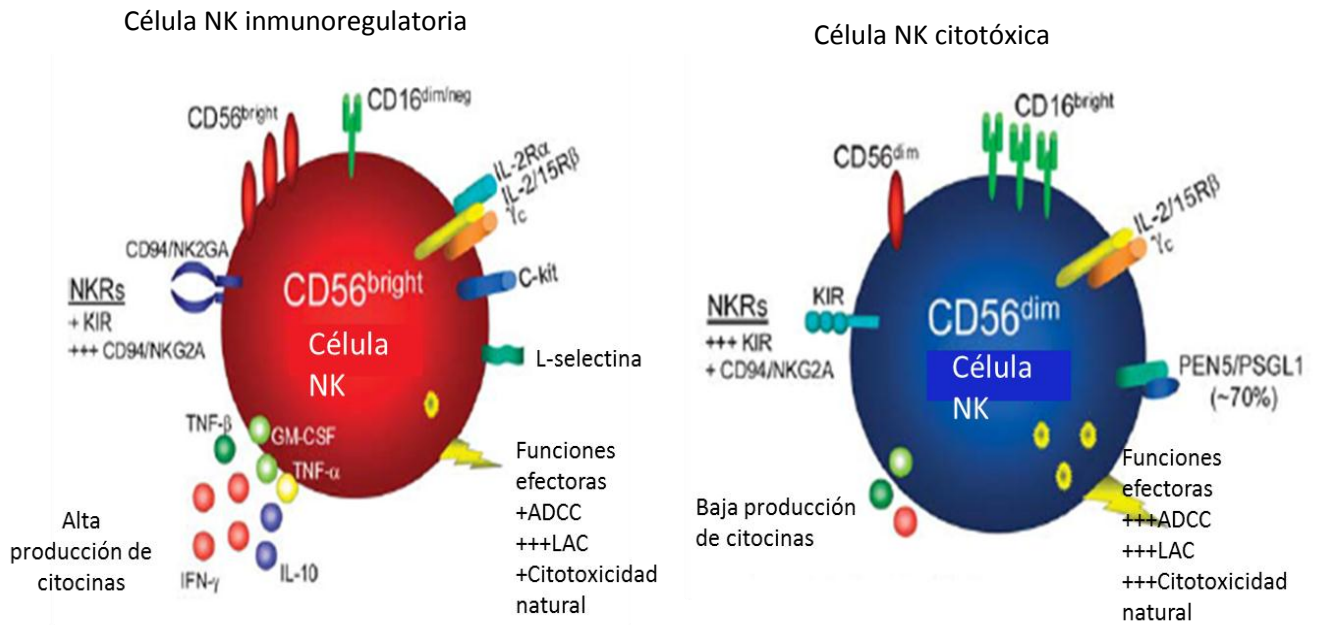


Figura 6. Poblaciones de células NK humanas. Las células NK CD56 bright son predominantemente inmunoregulatoras, producen altos niveles de citocinas después de la estimulación por monocinas. Tiene una baja expresión de CD16, baja citotoxicidad y ADCC. Las células NK CD56dim son esencialmente citotóxicas pero produce bajos niveles de citocinas en respuesta a estimulación por monocinas.

*Receptores de células NK: reconocimiento y muerte a blancos celulares*

Los receptores que regulan la actividad de las células NK caen dentro de tres grandes familias que contienen otros receptores de superficie. Los receptores de la superfamilia tipo inmunoglobulina Ig asesinos (KIR) que reconocen moléculas MHC de clase I clásicas, los receptores homólogos a las lectinas tipo C (KLR) reconocen moléculas MHC de clase I no clásicas y los receptores naturales de citotoxicidad (NCR) cuyos ligandos permanecen indefinidos. Otros NKR se han descrito como co-receptores, pero sus ligandos e importancia clínica siguen siendo desconocidos en algunos casos. Los genes que codifican para KLR se encuentran dentro de una agrupación de gen llamada complejo de receptor NK, o NKC. La Tabla 1 resume los principales NKR y sus ligandos. 13

Receptores tipo inmunoglobulina Ig asesinos (KIR)		Ligando
Inhibidor	Activador	
KIR2DL1	KIR2DS1	Grupo 2 HLA-C Asn77Lys80
KIR2DL2	KIR2DS2	Grupo 1 HLA-C Ser77Asn80
KIR2DL3		
	KIR2DL4	HLA-G
KIR2DL5	KIR2DS4	Desconocido
	KIR2DS5	Desconocido
	KIR3DS1	Desconocido
KIR3DL1		HLA-Bw4
KIR3DL2		HLA-A3, -A11
KIR3DL7		Desconocido

Tabla 1. Receptores de las células NK y sus ligandos.

<b>Receptores heterodiméricos tipo lectina C</b>		
<b>Inhibidor</b>	<b>Activador</b>	
<b>CD94/NKG2A/B</b>	<b>CD94/NKG2C</b>	HLA-E
		Desconocido
<b>CD94/NKG2E/H</b>		MICA, MICB, ULBP-1, -2, -3
<b>NKG2D</b>		
<b>Receptores naturales de citotoxicidad (NCR)</b>		
<b>NKp30</b>		Desconocido
<b>NKp46</b>		Desconocido
<b>NKp44</b>		Desconocido
<b>Transcritos tipo inmunoglobulina (ILT)</b>		
<b>ILT-1 (LIR-1)</b>		<b>Desconocido</b>
<b>Co-receptores activadores</b>		
<b>FCγRIII (CD16)</b>		<b>Fc de Ig</b>
<b>CD2</b>		<b>CD58 (LFA-3)</b>
<b>LFA-1</b>		<b>ICAM-1</b>
<b>2B4</b>		<b>CD48</b>
<b>NKp80</b>		<b>Desconocido</b>
<b>CD69</b>		<b>Desconocido</b>
<b>CD40 ligando</b>		<b>CD40</b>

Tabla 1. Receptores de las células NK y sus ligandos.

El modelo actual para la activación y la inhibición de las células NK está basado en el equilibrio de la función activadora e inhibitoria de sus receptores. Si el equilibrio favorece la señalización inhibitoria, eventos intracelulares conducen a que no progresen las funciones celulares. Si la balanza va a favor de las señales de activación, las células NK pueden entonces progresar a través de una serie de etapas intracelulares y puestos de control para ejercer su función inmunoreguladora o citotóxica. El balance de señales inhibitorias y estimulantes recibido por una célula NK determina el resultado de las interacciones con las células diana. (13,49,1)

#### *Receptores tipo inmunoglobulina de la célula NK (KIR)*

La estructura básica de los KIR se muestra en la figura 7. Los genes *KIR* se caracterizan por codificar para proteínas con número de dominios de inmunoglobulina que difieren, algunos poseen 2 Ig (KIR2D) y 3 Ig (KIR3D) dominios extracelulares que reconocen específicamente grupos de las moléculas de HLA de clase I. Además, los receptores KIR se clasifican de acuerdo con la longitud de sus regiones citoplasmáticas; largas (KIR2DL y KIR3DL) y cortas (KIR2DS y KIR3DS). La región citoplásmica determina las propiedades de su funcionalidad; los KIR de fragmento largo median una señal inhibitoria debido a la presencia de inmunoreceptor con motivos de inhibición basados en tirosina (ITIM) en sus dominios citoplasmáticos, mientras que los receptores de fragmento corto están asociados con señales de activación debido a su asociación con proteínas

adaptadoras que lleva inmunoreceptor con motivos de activación basados en tirosina (ITAM). (13,19,49)

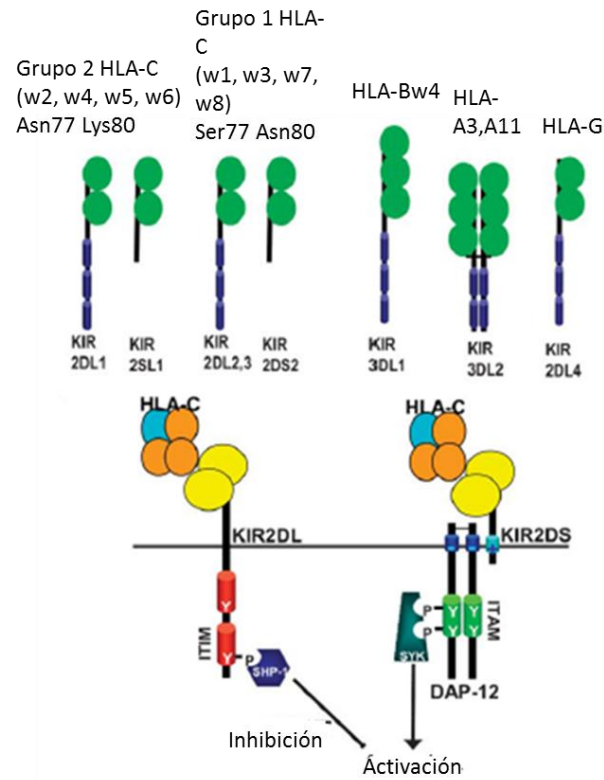


Figura 7. Estructura y función de KIR.

a) Clasificación de acuerdo al número de dominios Ig y al tamaño de la cola citoplasmática.

b) Inhibición y activación dependiendo del tamaño de la cola citoplasmática

### *Receptores heterodiméricos tipo lectina C (CD94/NKG2)*

Los receptores CD94/NKG2 son miembros de la superfamilia de las lectinas tipo C implicadas en el reconocimiento de moléculas HLA clase I. Lectinas de tipo C son una familia de proteínas de unión a carbohidratos dependientes de calcio. Los dominios de unión a carbohidratos (CRD) contienen aproximadamente 120 aminoácidos así como tres enlaces disulfuro y una característica CA2C bucle que es esencial para la unión de hidratos de carbono.

Colectivamente, estos receptores son referidos como miembros del tipo lectina receptor de tipo C (CTLR) superfamilia. CD94 y los miembros de la familia de los receptores de NKG2 y Ly49 son parte de la Superfamilia CTLR.

### *Mecanismos de citotoxicidad*

Las células pueden matar algunas células infectadas por virus y células diana tumorales independientemente de la expresión de MHC. Las células NK poseen un número relativamente grande de gránulos citolíticos, que son lisosomas secretores que contienen perforinas y diversas granzimas. Tras el contacto entre una célula NK y su blanco, estos gránulos viajan a la zona en donde está la célula diana (sinapsis inmunológica), el contenido se libera para efectuar la lisis celular. La citotoxicidad dependiente de la perforina, es el principal mecanismo de lisis de las células NK, aunque también pueden matar de manera independiente mediante el ligando FAS, TNF o ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), aunque de forma menos eficiente y de una cinética más lenta.

Las células NK poseen la capacidad de producir IFN-  $\gamma$ , pero también producen otras citocinas y quimiocinas, incluyendo TNF- $\alpha$ , GM-CSF, G-CSF, IL -5, IL - 13, CCL3/MIP-1a, CCL4/MIP-1b, CCL5/RANTES, XCL1, y CXCL8 (IL-8). Las células NK expresan varios ligandos coestimuladores incluyendo el CD40L (CD154) y OX40L, que proporcionan una señal coestimuladora a células T o células B. Así, las células NK pueden servir como puente en un bucle interactivo entre la inmunidad innata y adaptativa. (14)

El proceso por el cual las células NK median la destrucción de células transformadas se produce en cuatro identificables etapas: unión a células diana (formación de conjugado), activación de células efectoras (reconocimiento/transducción de la señal), entrega de moléculas o señales efectoras citotóxicas ("golpe letal") y el desprendimiento de células efectoras y reciclaje.

### Organización genómica de la familia NKG2

La familia de receptores NKG2 (*natural killer group 2*) se encuentra formada por cinco miembros (NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E y NKG2F) que son codificados dentro de una región de 270Kb con alto ligamiento en el brazo corto del cromosoma 12 en la región 13.2-12.3 que codifica para el complejo "Natural Killer" (NKC) Figura 8. Los receptores NKG2 (A, C, E y F) se expresan en forma heterodímera unidos a CD94, el cual es codificado dentro del mismo cromosoma, aunque la excepción es el gen D que se expresa en forma homodímera. Estos receptores pueden clasificarse de acuerdo a su función activadora o inhibidora. El receptor NKG2A es inhibidor y presenta en la región citoplasmática motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*); en cambio el receptor NKG2C su función es activadora al asociarse con la molécula adaptadora DAP12. NKG2A y NKG2C se unen a la molécula HLA-E, molécula de clase I no clásica. Aunque no es claro como los receptores NKG2-CD94 interactúa con HLA-E, su afinidad por la molécula difiere, siendo ésta más fuerte con el receptor NKG2A que con NKG2C. También el homodímero NKG2D tiene función activadora y necesita la presencia de la molécula adaptadora DAP10 para que inicie su actividad. Este receptor se

une a las moléculas MICA y MICB. Mientras los receptores E y F no tienen una función descrita hasta el momento. (22,13,33,34)

Imai y colaboradores en 2006 evaluaron factores genéticos asociados a la actividad citotóxica. El grupo analizó la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) dentro de la región génica denominada *Natural Killer Complex*, encontrando que la actividad citotóxica de la célula NK puede ser definida con base en la presencia de SNPs. En estos términos, se presentan dos haplotipos. El primero denominado hb-1 que se caracteriza por la presencia de cinco SNPs de los genes D, F y A [NKG2D (C17288G), NKG2F (T-4068A, T1413C y C1091G) y NKG2A (C-798G)]. Mientras que el segundo haplotipo se conoce como hb-2 y está formado por un SNP del gene D (A7374G) y uno de NKG2F (G5326A). Ambos haplotipos, hb-1 y hb-2, generan dos haplotipos diferentes de acuerdo a su actividad citotóxica, uno de baja (LNK) y otro de alta (HNK) actividad, que se conocen como LNK1, LNK2, HNK1 y HNK2 respectivamente. (30,31)

Interesantemente, se observó que el haplotipo de baja citotoxicidad (LNK1) se encuentra asociado al desarrollo de cáncer colorectal en población japonesa. (52)



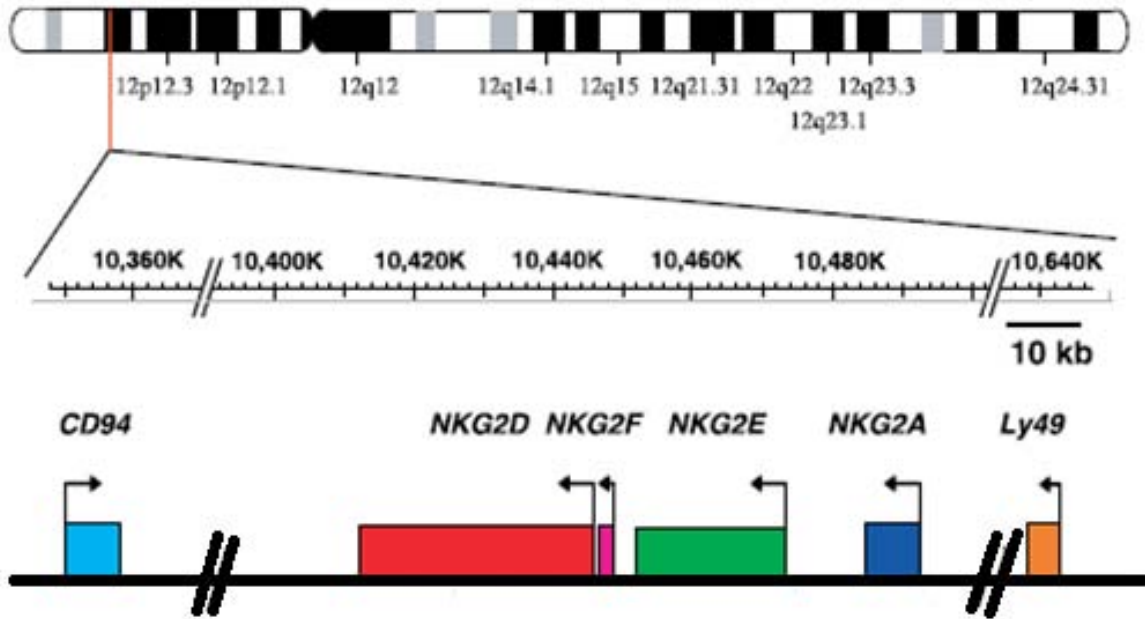


Figura 8. Organización genómica de la familia NKG2.

### NKG2D

NKG2D es un receptor transmembranal tipo II miembro de la familia de lectinas tipo C que forma un homodímero el cual ha recibido considerable atención debido a la evidencia de su función en la respuesta inmune en el contexto del cáncer, infección y autoinmunidad. NKG2D se expresa en prácticamente todas las células NK, linfocitos T CD8<sup>+</sup> y subconjuntos de células T  $\gamma\delta$  y NKT61. En ciertas condiciones, NKG2D se expresa también en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Se han identificado numerosos ligandos de NKG2D, todos los cuales son proteínas propias similares a moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I (MHC de clase I). Sin embargo, las células normalmente no expresan los ligandos en niveles sustanciales, sino que a menudo

son regulados por incremento específicamente en tejidos cancerosos o estresados.

Se ha acumulado evidencia que demuestra que NKG2D tiene una función importante en la inmuno vigilancia de los tumores. La eliminación dependiente de NKG2D de las células tumorales que expresan ligandos de NKG2D ha sido bien documentado en experimentos in vitro e in vivo de trasplante de tumor. En los seres humanos, polimorfismos específicos del gen NKG2D han sido asociados con susceptibilidad a cáncer. (39)

#### *NKG2F(KLRC4)*

NKG2F es un miembro de la familia de genes de NKG2, la proteína NKG2F humana es similar a NKG2C en que posee un residuo de lisina en la región transmembranal, tiene un motivo ITIM en la cola citoplásmica. La proteína NKG2F tiene una región extracelular relativamente corta que no contiene un dominio de lectina tipo C.

Como se había mencionado se localiza en el brazo corto del cromosoma 12 en la región 13.2-12.3 que codifica para el complejo "*Natural Killer*" (NKC).

Se compone de las siguientes regiones génicas. Figura 9.

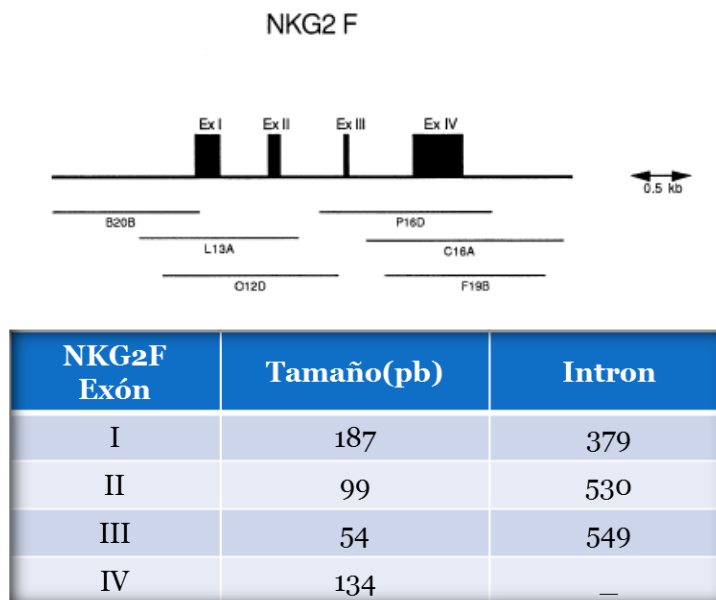


Figura 9. Representación de la composición del gen KLRC4 (NKG2F).

Su expresión parece estar confinada a los compartimentos intracelulares debido probablemente a su incapacidad para asociarse con CD94. Sin embargo, puede asociarse con DAP12 proporcionando con ello la señalización potencial de activación. Dado que se carecen de anticuerpos disponibles contra NKG2F, las características de expresión en células NK siguen siendo poco claras. (39)

## Polimorfismos de un solo nucleótido

Existen variaciones de secuencia en posiciones definidas dentro de los genomas y son responsables de las características fenotípicas individuales, incluyendo la propensión de una persona hacia trastornos complejos como enfermedades del corazón y cáncer.

El primer borrador de la secuenciación del genoma humano publicado en 2001, no solo puso de manifiesto la secuencia de pares de base que componen el DNA, la cartografía y un número reducido de genes, sino que también reportó una gran cantidad de variantes génicas comunes. Por un lado el consorcio público reportó 1.4 millones, mientras que el privado 2 millones de variantes tipo SNP. Un hallazgo sorprendente fue encontrar una gran similitud entre dos genomas humanos, cualquiera de estos comparten un 99.9% de identidad de secuencia. El otro 0.1% representa la variabilidad genética entre individuos.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), representan a las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano. Debido a su amplia distribución, estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes. Consisten en la sustitución de un nucleótido ya sea por inserción o deleción, ocurren con una frecuencia de aproximadamente 1 por cada 1000 pares de bases. Actualmente se han descrito más de 10 millones de SNP, aunque se ha estimado que existen aproximadamente 20 millones de ellos, alcanzando una distribución de aproximadamente un SNP cada 100-300 nucleótidos. (52)

Como se había mencionado un SNP se origina cuando una mutación puntual ocurre en el genoma, convirtiendo un nucleótido en otro. Si la mutación ocurre en las célula reproductivas de un individuo, pudiendo ser heredada por uno o mas descendientes y después de muchas generaciones, el SNP puede establecerse en la población.

La estabilidad evolutiva es una característica clave de los SNPs, lo que facilita su seguimiento en estudios poblacionales y, por tanto, que sirven como excelentes marcadores biológicos para enfermedades así como para la construcción de mapas de localización de loci cromosómicos en el genoma humano.

Los estudios de asociación genética están diseñados para comparar las frecuencias de los alelos o genotipos en el sitio de interés en poblaciones de casos y controles, con la expectativa de que variantes de susceptibilidad de la enfermedad sean asociadas con un mayor riesgo de enfermedad.

Los SNPs no causan enfermedad por sí mismos, pero podrían implicarse en la enfermedad, modificando la duración y/o gravedad de la enfermedad o influir en la respuesta al fármaco y por tanto la eficacia del tratamiento. (42)

## JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer de mama es una de las neoplasias malignas más importantes por su frecuencia y su mortalidad, además de constituir la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres. Uno de los factores más importantes es la susceptibilidad genética individual en el riesgo de cáncer mamario. Con la reciente decodificación del genoma humano y aplicación de nueva tecnología ha permitido un desarrollo sustancial a mediano plazo que logra identificar mujeres con alto riesgo genético de cáncer mamario, así como implementar programas de tamizaje poblacional, para detectar mutaciones como las de los genes BRCA1 y BRCA2, lo que da lugar a encontrar marcadores biológicos para la enfermedad como son los SNP; los cuales si bien no provocan la enfermedad por sí mismos podrían implicarse en esta, modificando la duración, la gravedad de la enfermedad o influir en la respuesta al fármaco y por tanto la eficacia del tratamiento.

## HIPÓTESIS

Los polimorfismos de un solo nucleótido del gen KLRC4 se asocian con cáncer de mama.

## OBJETIVOS

### *Objetivo general*

Determinar si los polimorfismos de un solo nucleótido del gen KLRC4 se asocian con cáncer de mama.

### *Objetivos particulares*

- Tipificar los SNPs rs2617170, rs2617171 y rs2246809 del gen KLRC4 en pacientes con cáncer de mama.
- Identificar la presencia de los SNPs del gen KLRC4 en el grupo control.
- Determinar la frecuencia alélica, génica y haplotípica de los SNPs del gen KLRC4 en pacientes con cáncer de mama y en el grupo control.
- Comparar las frecuencias observadas en la población de estudio con la frecuencia observada en otras poblaciones.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del estudio

Estudio de casos y controles

### Universo de estudio

Pacientes con diagnóstico de cáncer de mama en estadio fase 1 que acudan al Hospital de Oncología del CMN-SXXI.

### Población de estudio

Se incluirán dos grupos de individuos adultos. El primer grupo estará constituido por pacientes que padezcan cáncer de mama y el segundo grupo serán mujeres sanas que acudan al Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

### Criterios de inclusión

#### Paciente

- Diagnóstico de cáncer de mama
- Mayores de 30 años de edad o más al momento del diagnóstico.
- Género Femenino.
- Ser mexicano con ascendencia de dos generaciones mexicanas o más.

## Control

- Mujer sana
- Sin antecedentes familiares de cáncer, diabetes y espondiloartropatías como: espondilitis anquilosante, artritis reumatoide o artropatía psoriásica.
- Ser mexicana con ascendencia de dos generaciones mexicanas o más.

## Criterios de exclusión

### Paciente

- Pacientes que estén embarazadas.
- Diagnóstico de alguna enfermedad autoinmune, espondiloartropatía, diabetes u otro tipo de cáncer.

## Criterios de eliminación (Paciente y Control)

- Muestra insuficiente de sangre.
- Resultados incompletos de genotipificación.

## *Tamaño de muestra*

Se estudiarán 194 controles y 329 pacientes con cáncer de mama que acudan a la UMAE Hospital de Oncología CMN-SXXI. El tamaño de muestra se ha calculado de acuerdo a una frecuencia mínima del 10% por alelo, con un OR de 3.5, confianza del 95%, poder estadístico del 80% y  $\alpha$  de 0.05.

### *Controles*

Se estudiaron 194 muestras de mujeres sanas pertenecientes al Valle de México, donadoras del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Ninguna mujer reporta algún diagnóstico de cáncer de mama o de alguna otra enfermedad. Todas son mayores de edad, se les aplicó el cuestionario correspondiente al estudio y firmaron el consentimiento para ser incluidas.

### *Pacientes*

Por otro lado, se analizaron 329 muestras de pacientes sin tratamiento al momento de la toma de muestra, a las cuales se les confirmó cáncer de mama por mastografía e histología, provenientes del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las muestras son de mujeres pertenecientes al Valle de México, todas mayores de edad, ninguna reporta padecer otra enfermedad y se incluyeron previo consentimiento informado.

### *Extracción de DNA*

Se realizó la toma de muestra de sangre por punción venosa de las pacientes con cáncer de mama y controles mediante sistema vacutainer en tubo sin anticoagulante (BD®, tubo rojo) y en tubo con EDTA (BD®, tubo morado). Se centrifugó para obtener el suero y el plasma de los tubos correspondientes.

Del tubo rojo se resuspendió el paquete globular con el suero restante en el vortex (VWR Scientific Products, 045300) y se transfirió una alícuota a 2 tubos eppendorf de 1.5 mL, se agregó Buffer de Lisis 1 para lisar los eritrocitos y se centrifugó. Se decantó el sobrenadante y se agregó Buffer de Lisis 1 y se centrifugó (ALC, 4214-

U1). Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se agregó Buffer de Lisis 2 para lisar los leucocitos, SDS al 20% (IBI, Shelton Scientific, Peosta, Iowa USA.) y  $\text{NaClO}_4$  (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA.), se colocaron en el agitador vertical (Scinics, SHK-COCK) por 10 minutos. Por último se agregó  $\text{NaCl}$  5M (Productos Químicos Monterrey, Monterrey, N.L. México para separar el DNA de las proteínas y se centrifugó (ALC, 4214-U1). Se obtuvo el sobrenadante y se trasvasó a dos tubos eppendorf debidamente rotulados, se agregó Isopropanol frío (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA.) para precipitar el DNA y se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  (American) durante 24 horas.

Se centrifugaron los tubos (Hettich, Universal 30 F) y se decanta para lavar con etanol al 70% (J.T. Baker, Xalostoc, México), se centrifugaron y se repitió el lavado. Se descartó el etanol del último lavado para dejar secar durante por inversión y se resuspendió con  $\text{H}_2\text{O}$  inyectable.

Estos tubos de DNA extraído de pacientes y controles se consideraron como el DNA stock a partir del cual se prepararon las diluciones de las muestras.

### *Cuantificación del DNA*

Para la cuantificación del DNA se utilizó el espectrofotómetro Nano Droop 1000 (Thermo Scientific). Se calibró con una muestra blanco, siendo esta agua estéril y se obtuvieron las absorbancias en la longitud de onda de 260 y 280 nm para determinar la pureza y la concentración de las muestras extraídas.

### *Electroforesis horizontal*

Se preparó un gel de agarosa al 1% (IBI Scientific, Peosta, Iowa USA). Se pesó la agarosa en la balanza granataria digital (Fisher Scientific, XT-400D), se transfirió a un matraz Erlenmeyer (Pyrex) y se agrega TBE. Posteriormente, se disolvió la agarosa en el horno y se agregó Bromuro de Etidio, se transfirió a la cámara de electroforesis (Stratagen, 010402), se colocaron los peines y se dejó gelificar. Se retiraron los peines, se cargaron las muestras en la micropipeta (Thermolabs Systems) y se mezcló con buffer de carga en la misma proporción. Finalmente, se agregó la mezcla a los pocillos. Se programó la fuente de poder (LabNet, Power Station 2000) con las condiciones adecuadas. Y finalmente se identificaron las bandas del gel en un transiluminador acoplado a un fotodocumentador (BIO RAD).

### *Preparación de las diluciones de la muestra*

A partir del DNA stock se prepararon las diluciones de trabajo a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L en un volumen final de 50  $\mu$ L. Por lo cual se calcularon los volúmenes requeridos de DNA genómico a partir de la muestra stock almacenadas en el congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$  (REVCO, ULT1386-3-A40) para el experimento de genotipificación. La concentración final de la dilución es de 30.0 ng/mL.

Se añadieron 1.54  $\mu$ L de agua libre de DNasa (PiSA) a cada tubo. (ThermoLab Systems, Micropipeta)

Se añadieron 0.66  $\mu$ L de la muestra stock a cada tubo, para que la dilución sea 2.20. (ThermoLab Systems, Micropipeta,)

Se agitó con vortex (VWR Scientific Products) cada dilución de la muestra de 3 a 5 segundos, a continuación, centrifugar los tubos brevemente.

### Condiciones de la PCR

Etapa/Paso	Pre-PCR		Ciclaje térmico		Post-PCR
	Tiempo de calentamiento	Tiempo de calentamiento	Ciclaje (50 ciclos)		Tiempo de calentamiento
			Desnaturalización	Alineamiento/ Elongación	
<b>Temperatura</b>	60°C	95°C	92°C	60°C	60°C
<b>Tiempo (mm:ss)</b>	00:30	10:00	00:15	01:00	00:30
<b>Recopilación de datos</b>	Si	No	No	Si	Si

Tabla 2. Condiciones de la PCR

Nota: En el método anterior, la recopilación de datos se activa para la etapa de Alineamiento / Extensión de modo que el instrumento recoge datos en tiempo real durante la PCR. Aunque los datos en tiempo real no sean necesarios para el genotipado, los datos pueden ser útiles para la solución de problemas cuando la PCR falla.

El software traza y denomina automáticamente los genotipos basado en un parámetro de dos gráficas con intensidades de fluorescencia de los fluorocromos FAM y VIC en 50 ciclos.

### *Preparación de la mezcla de reacción*

Se preparó la mezcla de reacción para el experimento utilizando los volúmenes calculados por el software StepOne. Este determina qué componentes de la mezcla de reacción se deberá utilizar en función de la selección realizada en los métodos y materiales.

Para los experimentos de genotipificación, la mezcla de reacción contiene todos los componentes, excepto la muestra, buffer o control positivo, como se indica en la Tabla 3.

Se debe realizar en condiciones estériles en una cámara de PCR (PLAS LABS). Se pipeteó suavemente la mezcla de reacción (LabNet, Micropipeta), de arriba abajo, a continuación, se tapó el tubo. Se centrifugó el tubo brevemente (Eppendorf, 5804).

### *Preparación de la reacción en placa*

La placa de reacción se montó con las diluciones y con la mezcla de reacción previamente realizadas en una cámara para PCR (PLAS LABS).

Se pipetearon (LabNet, Micropipeta) 2.5  $\mu$ L de cada muestra (3 a 20 ng de DNA genómico purificado) con 8.75  $\mu$ L de agua libre de DNAsa (PiSA) para completar el volumen indicado en la Tabla 3 en cada pocillo de una placa de reacción de 48 pozos (Applied Biosystems, MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate).

Componente	Volumen por pozo ( $\mu\text{L}$ )
<b>Mezcla de reacción universal PCR TaqMan® (2X)</b> (Invitrogen, Brown Deer, Wisconsin USA)	12.50
<b>Mezcla del ensayo del SNP (20X)</b> (Applied Biosystems, Foster City USA)	1.25
<b>Agua libre de DNAsa</b>	11.25
<b>Volumen total</b>	25.00

Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción

Todos los pocillos que pertenecen al mismo ensayo de genotipificación deben contener la misma cantidad de muestra o control.

Se dejaron secar las muestras por evaporación a temperatura ambiente en un lugar oscuro. (Se cubrió la placa de reacción con un paño libre de pelusa durante el secado (Kimwippes, Kimberly Clark)).

Se transfirieron 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a cada pocillo. Se cubrió la placa con la película adhesiva (Applied Biosystems, MicroAmp® Optical 48-Well Adhesive Film) y se agitó con vortex (VWR Scientific Products, 045300) de 3 a 5 segundos, se centrifugó por 1 minuto (Eppendorf, 5804) confirmando que el líquido se mantuviera en el fondo de cada pocillo de la placa, evitando la formación de burbujas. Si no, centrifugar la placa de nuevo a mayor velocidad y por un período de tiempo más largo.

Para los pocillos con control negativo se agregaron 11.25  $\mu\text{L}$  de agua libre de DNAsa (PiSA), mientras que para los pocillos con control positivo se agregan 11.25  $\mu\text{L}$  de control positivo (LabNet, Micropipeta).

Al preparar la placa de reacción para el experimento se debe considerar lo siguiente:



Una vez terminado se cargó la placa de reacción sellada en el termociclador (Applied Biosystems, StepOne™ o instrumento StepOnePlus™). Si se utilizó una placa de reacción se coloca la placa en el bloque con el pocillo A1 en la esquina posterior izquierda. Si se utilizaron tiras de tubos de reacción se debe colocar la bandeja que soporta las tiras de tubos en el bloque. Si se utilizaron tubos de reacción se debe colocar la bandeja que contiene los tubos en el bloque.

Se programó el equipo para generar el archivo de la corrida y una vez que todo está listo se le indicó que empiece la corrida, se dejó correr y una vez concluido se analizó el experimento.

### Sondas

Se determinó la secuencia de referencia (rs) con las sondas de Applied Biosystems siguiendo las instrucciones del proveedor.

RefSNP	Posición en el cromosoma	Posición en el gen	Región	Sentido del SNP respecto al mRNA	Alelo ancestral	Alelo	MAF/ Frecuencia del alelo menor
<b>rs2617170</b>	10560957	Exón 4 posición 172	UTR'5	Rev	T	T/C T/g	T= 0.4011/876
		Exón 4 Posición 493	Sin sentido	Sentido del SNP respecto al cromosoma	Rev		
<b>rs2617171</b>	10561279	-----	Intrón	Fwd	C	C/g	C= 0.4556/995
<b>rs2246809</b>	10557044	-----	Intrón	Fwd	g	A/g	A= 0.183/399

Tabla 4. Información de los SNP's empleados en el estudio de genotipificación.

Una vez que se tienen los resultados de la genotipificación se genera una base de datos para poder emplear el programa Haploview y obtener los resultados de los experimentos realizados. Los cuales se describen a continuación.

## RESULTADOS

#	rs	Posición	ObsHET	PredHET	HWpval	MAF	Alelos
1	rs2246809	10557044	0.134	0.125	0.8153	0.067	G:A
2	rs2617170	10560957	0.407	0.46	0.141	0.358	C:T
3	rs2617171	10561279	0.412	0.464	0.1519	0.366	G:C

Tabla 5. Equilibrio de Hardy Weinberg de las muestras control de los 3 SNP's empleados.

MAF= frecuencia del alelo menor

En la tabla 5 podemos ver que el estudio de los 3 SNPs del gen KLRC4 cumplen el equilibrio de Hardy Weinberg ( $p$  no es  $\leq 0.05$ ). También se incluye el nombre del SNP, la posición que ocupa este en el cromosoma, la frecuencia observada y esperada de los heterocigotos, la frecuencia global del alelo menor (MAF) y los alelos implicados para cada SNP.

#	rs	Asociación de Alelo	Relación Caso: Control	Frecuencias: Caso:Control	Chi cuadrada	Valor de p
1	rs2246809	A	59:599, 26:362	0.090, 0.067	1.678	0.1952
2	rs2617170	C	429:229, 249:139	0.652, 0.642	0.112	0.738
	rs2617171	G	430:228, 246:142	0.653, 0.634	0.405	0.5246

Tabla 6. Asociación de los 3 SNP's empleados.

En la tabla 6 se observa la asociación existente entre los SNP's en estudio. El valor de  $p \geq 0.05$  por lo cual no hay una diferencia significativa entre los valores de  $p$  de los SNP's. En esta tabla la relación Caso:Control nos indica la proporción de cada uno de los alelos en los genotipos presentados en cada una de las

poblaciones estudiadas. Considerando como ejemplo el rs2617170 la relación Caso:Control obtenida es 429:229, 249:139; es decir, que para los pacientes el número de alelos C en la población de estudio considerando la contribución de homocigotos (CC) y de heterocigotos (CT) es de 429 alelos, mientras que para el alelo T haciendo la misma consideración de homocigotos (TT) y heterocigotos (CT) es de 229. Para las muestras control haciendo la misma consideración el número de alelos C es de 249 y de alelos T es de 139.

Las frecuencias que se muestran corresponden a las frecuencias alélicas tanto para las muestras control como para las muestras de pacientes. Retomando como ejemplo el rs2617170 la frecuencia del alelo C para los pacientes es de 0.652 y para los controles su frecuencia alélica es de 0.642. Se muestra también el valor de la prueba chi cuadrada el, dicha prueba es el procedimiento estadístico habitual para contrastar la presencia de asociación.

rs	Alelos	CaMa n=329 2n=658 Frecuencia (%)	Controles n=194 2n=388 Frecuencia (%)	OR	95% IC	Valor de p
rs2246809	G	599 (91.05)	362 (93.3)	0.7292	0.4514-1.778	0.1952
	<sup>a</sup> A	59 (8.95)	26 (6.7)	1.3714	0.8490-2.2151	0.1952
rs2617170	C	429 (65.2)	249 (64.5)	1.0458	0.8045-1.3594	0.7380
	<sup>b</sup> T	229 (34.8)	139 (35.5)	0.9562	0.7356-1.2430	0.7380
rs2617171	G	430 (65.5)	246 (63.5)	1.0886	0.8380-1.4142	0.5245
	<sup>c</sup> C	228 (34.5)	142 (36.5)	0.9186	0.7071-1.1933	0.5245

Tabla 7. Frecuencias alélicas, OR, IC y valor de p de los 3 SNP's en estudio. El Odds ratio se calculó para los pacientes. <sup>a</sup>El alelo menor A vs G del rs 2246809. <sup>b</sup>El alelo menor T vs C del rs2617170. <sup>c</sup>El alelo menor C vs G del rs2617171.

Se evaluaron los datos de los alelos, para contabilizar el número de alelos de cada SNP del gen KLRC4 contemplando la contribución de cada uno para homocigotos y heterocigotos para calcular las frecuencias alélicas para pacientes y controles y así determinar el "odds ratio" o razón de momios (OR), ya que permite reconocer la asociación de los alelos de cada uno de los SNP's del gen KLRC4 con la enfermedad o bien si confieren un efecto protector contra la enfermedad. El intervalo de confianza y el valor de p se obtuvieron con el programa Epi Info<sup>TM</sup>7.

rs	Genotipo	CaMa n=329 Frecuencia (%)	Controles n=194 Frecuencia (%)	OR	95% IC	Valor de p
rs2246809	A/G	53 (16.1)	26 (13.4)	—	—	—
	G/G	273 (83)	168 (86.6)	0.7545	0.4561-1.2480	0.2715
	A/A	3 (0.9)	0	—	—	—
rs2617170	C/T	143 (43.5)	79 (41)	—	—	—
	<sup>a</sup> C/C	143 (43.5)	85 (44)	0.9859	0.6894-1.4099	0.9379
	<sup>b</sup> T/T	43 (13)	30 (15)	0.8219	0.4964-1.3608	0.4454
rs2617171	C/G	142 (43)	80 (41)	—	—	—
	<sup>c</sup> G/G	144 (44)	83 (43)	1.0410	0.7275-1.4894	0.8261
	<sup>d</sup> C/C	43 (13)	31 (16)	0.7905	0.4791-1.3037	0.3564

Tabla 8. Frecuencias genotípicas, OR, IC y valor de p de los 3 SNP's en estudio. El Odds ratio se calculó para los pacientes. El genotipo G/G vs los genotipos A/A + A/G del rs 2246809. <sup>a</sup>El genotipo C/C vs los genotipos T/T + C/T y <sup>b</sup>el genotipo T/T vs los genotipos C/C + C/T del rs 2617170. <sup>c</sup>El genotipo G/G vs los genotipos C/C + G/C y <sup>d</sup>el genotipo C/C vs los genotipos G/G + G/C del rs 2617171.

De la misma forma se contabilizaron el número de genotipos para cada SNP del gen KLRC4 para determinar la frecuencia genotípica y posteriormente el "odds ratio" o razón de momios (OR), el intervalo de confianza y el valor de p. Estos resultados se obtuvieron con el programa Epi Info<sup>TM</sup>7.

Bloque	Haplotipo	Frecuencia	Relación Caso: Control	Frecuencias: Caso:Control	Chi cuadrada	Valor de p
1	GCG	0.637	425:233, 242:146	0.645, 0.623	0.516	0.4725
2	GTC	0.264	165:493, 111:277	0.251, 0.286	1.56	0.2117
3	ATC	0.08	59:599, 25: 363	0.089, 0.064	2.099	0.1474

Tabla 9. Bloques de Haplotipos formados por la asociación de los 3 SNP'S

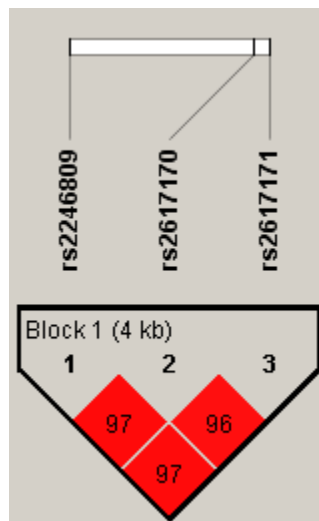
La Tabla 9 muestra el número de haplotipos formados con los 3 SNP del gen KLRC4, la frecuencia del haplotipo, la relación caso control, la frecuencia de los haplotipos y el valor de p. Con lo cual podemos ver que se encuentran con mayor fuerza de ligamiento los alelos G del rs 2246809, C del rs 2617170 y el G del rs 2617171.

Bloque de Haplotipos	CaMa n=658 Frecuencia (%)	Controles n=388 Frecuencia (%)	OR	95% IC	Valor de p
GCG	425	242	1.1005	0.8483-1.4275	0.4708
	233	146	0.9087	0.7005-1.1788	0.4708
GTC	165	111	0.8352	0.6299-1.1074	0.2105
	493	277	1.1973	0.9031-1.5874	0.2105
ATC	59	25	1.4302	0.8801-2.3242	0.1469
	599	363	0.6992	0.4303-1.1363	0.1469

Tabla 10. Frecuencias haplotípicas, OR, IC y valor de p de los 3 SNP's en estudio. El Odds ratio se calculó para los pacientes.

A si también se contabilizaron el número de haplotipos formados con los 3 SNP del gen KLRC4 para determinar la frecuencia del haplotipo, la relación caso control, la frecuencia de los haplotipos y el valor de p.

Figura 10.  
Diagrama de los Haplotipos conformados por los 3 SNP's, obtenidos por el programa Haploview.



En la figura 10 encontramos los bloques de haplotipos que se forman al asociar los 3 SNP'S. El recuadro donde se señalan los SNP's nos indica la posición que tienen estos en el cromosoma, por lo cual sabemos que el rs2246809 se encuentra más cercano al rs2617170 que al rs2617171 y que el rs2617170 se encuentra más cerca del rs2617171.

En las tablas 11, 12 y 13 se muestran las diferentes frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP's estudiados en diferentes poblaciones y reportadas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para la comparación con los datos obtenidos en nuestro estudio.



Población	Grupo individual	Muestra	Fuente	Genotipo			Valor de p	Alelos	
				C/C	C/G	G/G		C	T
<b>ENSEMBL_Watson</b>	—	—	IG	—	1	—	—	0.5	0.5
<b>ENSEMBL_Venter</b>	—	—	IG	—	1	—	—	0.5	0.5
<b>HapMap-CEU</b>	Europeo	116	IG	0.086	0.448	0.466	0.752	0.310	0.690
<b>HapMap-HCB</b>	Asiático	86	IG	0.209	0.372	0.419	0.150	0.395	0.605
<b>HapMap-JPT</b>	Asiático	86	IG	0.163	0.326	0.512	0.100	0.326	0.674
<b>HapMap-YRI</b>	África del Sur	110	IG	0.545	0.364	0.091	0.584	0.727	0.273

Tabla 11. Frecuencias del SNP rs 2617171 en diferentes poblaciones.

Población	Grupo individual	Muestra	Fuente	Genotipo			Valor de p	Alelos	
				C/C	C/T	T/T		C	T
<b>ENSEMBL_Watson</b>	—	2	IG	—	1	—	—	0.5	0.5
<b>ENSEMBL_Venter</b>	—	2	IG	—	1	—	—	0.5	0.5
<b>HapMap-CEU</b>	Europeo	118	IG	0.475	0.458	0.068	0.479	0.703	0.297
<b>HapMap-HCB</b>	Asiático	90	IG	0.422	0.356	0.222	0.100	0.600	0.400
<b>HapMap-JPT</b>	Asiático	88	IG	0.500	0.341	0.159	0.150	0.670	0.330
<b>HapMap-YRI</b>	África del Sur	226	IG	0.186	0.566	0.248	0.150	0.469	0.531

Tabla 12. Frecuencias del SNP rs 2617170 en diferentes poblaciones.

Población	Grupo individual	Muestra	Fuente	Genotipo			Valor de p	Alelos	
				A/A	A/G	G/G		A	G
<b>ENSEMBL_Watson</b>	—	2	IG	—	1	—	—	0.5	0.5
<b>ENSEMBL_Venter</b>	—	2	IG	—	1	—	—	0.5	0.5
<b>HapMap-CEU</b>	Europeo	226	IG	0.044	0.283	0.673	0.527	0.186	0.814
<b>HapMap-HCB</b>	Asiático	86	IG	—	0.209	0.791	0.752	0.105	0.895
<b>HapMap-JPT</b>	Asiático	172	IG	0.070	0.244	0.686	0.050	0.192	0.808
<b>HapMap-YRI</b>	África del Sur	226	IG	0.009	0.389	0.602	0.050	0.204	0.796
<b>HapMap-Mex</b>	Mexicano	100	IG	0.020	0.200	0.780	0.752	0.120	0.880

Tabla 13. Frecuencias del SNP rs 2246809 en diferentes poblaciones.

## DISCUSIÓN

Conocimientos recientes sobre los mecanismos complejos de la inmunidad innata humana sugieren que la variabilidad genética en los genes que codifican sus componentes pueden tener una función en el desarrollo de enfermedades.

Enfoques para descubrir y entender la variación y la posterior aplicación en la enfermedad se describen e ilustran en los estudios de asociación.

Aunque se encuentran altamente conservadas a través de una amplia gama de especies, los genes de la inmunidad innata demuestran variabilidad interindividual considerable, predominantemente en forma de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

La variación genética en estos genes pueden intervención importante en la determinación de la susceptibilidad a una variedad de enfermedades como el cáncer, ya sea modificando la duración y/o gravedad de la enfermedad o en la respuesta al fármaco y por tanto la eficacia del tratamiento. (42,43)

Los SNP's estudiados en este trabajo se seleccionaron con base en su posición. El SNP rs2617170 se encuentra ubicado en la posición 10560957 del cromosoma, dentro del exón 4 del gen NKG2F y es una transición T>C (Asn493Ser); el SNP rs2617171 encuentra ubicado en la posición 10561279 del cromosoma dentro de la región intergénica y es una tranversión C>G (sin cambio de aminoácido) y el SNP rs22246809 se encuentra ubicado en la posición 10557044 del cromosoma dentro de la región intergénica y es una transición A>G (sin cambio de aminoácido).

Los resultados corresponden a los 3 SNP's seleccionados para el estudio (rs2246809, rs2617170 y rs2617171) del gen KLRC4.

Al realizar estudios de asociación de enfermedades con otras poblaciones se deben considerar el desequilibrio de ligamiento, los haplotipos y las diferencias históricas en la población, las cuales han producido patrones distintivos de frecuencias de los alelos de los SNP. (43)

Por lo cual al comparar el MAF obtenido en el estudio con frecuencias reportadas en el NCBI en distintas poblaciones podemos encontrar que no son iguales, como lo muestran las tablas 11, 12 y 13. Esto debido a las diferentes contribuciones relativas de los componentes ancestrales de los genes en cada población.

En el caso de la población de estudio perteneciente al Valle de México se conoce que durante el periodo pre-hispánico, eran más numerosos los grupos étnicos que vivían en el centro y sur de México y contaban con una cohesión política, religiosa y social más sólida que los grupos étnicos de la región del norte. Entre 1545 y 1548 se trajeron esclavos negros a la región después del notable descenso de la población amerindia causada por las epidemias. Desde entonces, los procesos de mestizaje en regiones geográficamente distantes se han visto afectadas por diferentes condiciones demográficas e históricas que han modelado la estructura genómica de los mexicanos. Estos factores han generado heterogeneidad genética entre y al interior de las diferentes regiones de todo México. 48

Por lo anterior en nuestra población de estudio, se cuenta con un modelo ancestral trihíbrido compuesto de un 56% de genes indígenas, 41% de genes europeos y

3% de genes africanos, lo cual radica en las diferencias alélicas y genotípicas de los SNP's del gen KLRC4 estudiados en diferentes poblaciones y reportadas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

La comprensión de la variación en los genes de inmunidad innata radica en el desequilibrio de ligamiento (LD), que es una medida estadística del grado en que se asocian los alelos particulares en dos loci, uno con el otro en una población.

(43)

Los dos atributos estadísticos de LD de interés en ejercicios de cartografía genética son la magnitud y la significación estadística de LD. Los valores positivos de  $D$  sugieren que los alelos comunes en cada *locus* segregan juntos (acoplamiento); por lo cual podemos observar en el diagrama de Haplotipos (figura 10) 3 rombos de color rojo, cada uno tiene un valor en el centro y sus puntas indican la separación entre cada SNP. Siendo así que el haplotipo formado por el rs2246809 y el rs2617170 tiene una fuerza de asociación de 97, el haplotipo formado por el rs2617170 y el rs2617171 tiene una fuerza de asociación de 96 y por último el haplotipo formado por el rs2246809 y el rs2617171 posee una fuerza de asociación de 97. Cuando se tiene una fuerza de asociación entre los SNP's involucrados  $\geq 90$  se dice que están ligados (en desequilibrio de ligamiento), por lo tanto se heredan juntos.

Los haplotipos son los arreglos de alelos individuales o por cromosomas transmitidos. En enfermedades complejas donde puede haber más de un locus variante que contribuye a la susceptibilidad de la enfermedad, los haplotipos son

potencialmente importantes, ya que combinaciones de alelos particulares en el mismo gen (en cis, es decir, en el mismo cromosoma transmitido) puede dar lugar a diferentes efectos sobre las proteínas que se transcriben o que regulan la transcripción en comparación con los mismos alelos en trans. Además, los haplotipos ofrecen ventajas en términos de estadística de potencia para detectar una asociación verdadera con un tamaño de muestra dado en comparación con los análisis basados en SNP único o combinaciones de SNP. (43)

Es importante considerar que a pesar de no encontrar asociación de estos SNP's del gen KLRC4 con el cáncer de mama, probablemente puedan asociarse a algún otro padecimiento debido a que no se conoce completamente la función de este gen. Se consideró para el estudio pues se han encontrado estudios en el laboratorio y a nivel global en donde otro gen de la familia NKG2 (NKG2D) tiene una asociación estrecha con el desarrollo del cáncer. Por lo que se decidió investigar si podría existir asociación. A partir de estos experimentos se pueden abrir otra serie de evaluaciones para los demás miembros de la familia NKG2 pues su importancia inmunológica es amplia debido a las funciones que llevan a cabo.

## CONCLUSIONES

Se realizó la tipificación de los SNP's del gen KLRC4 (rs2617070, rs2617171 y rs 2246809) por PCR tiempo real en pacientes con cáncer de mama y en personas sanas.

Al establecerse las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas en los grupos de estudio se determinó que no existe asociación entre los polimorfismos del gen *NKG2F* con cáncer de mama por el índice OR en la población de estudio perteneciente al Valle de México.

Por la comparación de las frecuencias observadas de los SNP's en la población de estudio con las frecuencias reportadas en el NCBI en distintas poblaciones podemos encontrar que no son iguales, debido a las diferentes contribuciones relativas de los componentes ancestrales de los genes en cada población.

## PERSPECTIVAS

Se propone realizar el estudio de los demás receptores de la familia NKG2 (*NKG2A*, *NKG2B*, *NKG2C*, *NKG2D*, *NKG2E*, NKps) y KIR para determinar si alguno presenta asociación de sus polimorfismos con cáncer de mama por el índice OR en la población de estudio perteneciente al Valle de México.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Hanahan, D.; Weinberg, R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. **2000**, *100*, pp 57-70.
- 2 Hanahan, D.; Weinberg, R. Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell*. **2011**, *144*, pp 646-674.
- 3 Narod, SA. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. *Oncogene*. **2006**, *25*, pp 5832–5836.
- 4 Srinivasan,D.; Sims, JT.; Plattner, R. Aggressive breast cancer cells are dependent on activated Abl kinases for proliferation, anchorage-independent growth and survival. *Oncogene*. **2008**, *27*, pp 1095–1105.
- 5 Chen, X.; Weaver, J.; Bove, B.; Vanderveer, L. ; Weil, S.; Miron, A.; Daly, M.; Godwin, A. Allelic imbalance in BRCA1 and BRCA2 gene expression is associated with an increased breast cancer risk. *Human Molecular Genetics*, **2008**, *17*, pp 1336–1348.
- 6 Ripperger,T.; Gadzicki, D.; Meindl, A.; Schlegelberger,B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counseling. *European Journal of Human Genetics*, **2009**, *17*, pp 722 – 731.
- 7 Weigelt, B.; Peterse, J.; van 't Veer, L. Breast Cancer Metastasis: Markers And Models. *Nature Cancer*, **2005**, *5*, pp 591-602
- 8 Maza-Fernández, M.; Vecchi-Martini; E. El cáncer de mama en México: evolución, panorama actual y retos de la sociedad civil. *Salud Publica Mex*, **2009**; *51 supl 2*, pp S329-S334.
- 9 Knaul,F.; López Carrillo, L.; Lazcano Ponce, E.; Gómez Dantés, H.; Romieu,I.; Torres, G. Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud. *Salud Publica Mex*, **2009**; *51 supl 2*, pp S138-S140.
- 10 Torres-Mejía, G.; Ángeles-Llerenas, A. Factores reproductivos y cáncer de mama: principales hallazgos en América Latina y el mundo. *Salud Publica Mex*, **2009**; *51 supl 2*, pp S165-S171.



- 11 Franco-Marina, F.; Lazcano-Ponce, E.; López-Carrillo, L. Breast cancer mortality in Mexico. An age-period-cohort analysis. *Salud Publica Mex*, **2009**; *51 supl 2*, pp S157-S164.
- 12 Vivier, Eric; and Ugolini, Sophie. Natural Killer (NK) Cells. *In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, **2010**, pp 1-10.
- 13 Farag, S.; Caligiuri, MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews*, **2006**, *20*, pp 123–137.
- 14 Caligiuri, MA. Human natural killer cells. *Blood*. **2008**, *112*, pp 461-9.
- 15 Vivier, Eric; *et al.* Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*, **2011**, *331*, pp 44-49.
- 16 Konjevic, G.; Jurisic, V.; Jovic, V.; Vuletic, A.; *et al.* Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. *Immunol Res.*, **2012**, *52*, pp 139–156.
- 17 Carrega, P.; and Ferlazzo, G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Frontiers in Immunol.*, **2012**, *3*, pp 1-6.
- 18 Peixoto de Toledo, V. P.; Sathler-Avelar, R.; *et al.* Natural Killer Cells: Deciphering Their Role, Diversity and Functions. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, **2010**, pp 1-38.
- 19 Parham, P. Immunogenetics of killer-cell immunoglobulin-like receptors. *Tissue Antigens*, **2003**, *62*, pp 194–200.
- 20 Rajalingam, R. Overview of the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor System. *Immunogenetics*, **2012**, *882*, pp 391-414.
- 21 Radaev, S. and Sun, P.D. Structure And Function Of Natural Killer Cell Surface Receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2003**, *32*, pp 93–114.
- 22 Toneva, M.; Lepage, V.; Lafay, G.; *et al.* Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens*, **2001**, *57*, pp 358–362.

- 23 Hikami, K.; Tsuchiya, N.; Yabe, T. and Tokunaga, K. Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes and Immunity*, **2003**, *4*, pp 160–167.
- 24 Raulet, D. H. and Guerra, N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat. Rev. Immunol.*, **2009**, *9*, pp 568-580.
- 25 Nausch, N. and Cerwenka, A., NKG2D ligands in tumor immunity., *Oncogene*, **2008**, *27*, PP 5944–5958.
- 26 Zafirova, B.; Wensveen, F.M.; Gulin, M.; Polic, B., Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2011**, *68*, pp 3519–3529.
- 27 Raulet, D.H.; Gasser, S.; Gowen, B.G.; Deng, W.; and Jung, H. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, **2013**, *31*, pp 413–41.
- 28 Jamieson, A.M.; Diefenbach, A.; McMahon, C.W.; et al. The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing. *Immunity*, **2002**, *17*, pp 19–29.
- 29 de Kruijf, E. M.; et al. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer*, **2012**, pp 12-24.
- 30 Hayashi, T.; Imai, K.; Morishita, Y.; Hayashi, I.; Kusunoki, Y.; Nakachi, K. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res.* **2006**, *66*, pp 563-70.
- 31 Textor, S.; Fiegler, N.; Arnold, A.; et al. Human NK Cells Are Alerted to Induction of p53 in Cancer Cells by Upregulation of the NKG2D Ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res.*, **2011**, *71*, pp 5998-6009.
- 32 Gasser, S. and Raulet, D.H., The DNA Damage Response Arouses the Immune System. *Cancer Res*, **2006**, *66*, pp 3959-3962.

- 33 Gasser, S.; Orsulic, S.; Brown, E.J.; Raulet, D.H. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature Letters.*, **2005**, *436*, pp 1186-1190.
- 34 Glienke, J.; Sobanov, Y.; Brostjan, C.; et al. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex., *Immunogenetics*, **1998**, *48*, pp 163–173.
- 35 Beziat, V.; Hervier, B.; Achour, A.; Boutolleau, D.; Marfain-Koka, A.; Vieillard, V. Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood*. **2011**, *117*, pp 4394-6.
- 36 Middleton, D.; Curran, M.; Maxwell, L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol*. **2002**, *10*, pp 147-64.
- 37 Imai, K.; Hayashi, T.; Yamaoka, M.; et al. Effects of NKG2D haplotypes on the cell-surface expression of NKG2D protein on natural killer and CD8 T cells of peripheral blood among atomic-bomb survivors. *Hum Immunol*. **2012**, *73*, pp 686-91.
- 38 Furue, H.; Matsuo, K.; Kumimoto, H.; et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. *Carcinogenesis*. **2008**, *29*, pp 316-20.
- 39 Kim, DK. Juraj Kabat, J.; et al. Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12., *Mol. Immunol.*, **2004**, *41*, pp 53–62.
- 40 Ries, L.; Kosary, CL.; Hankey, BF.; Miller, BA.; Edwards, BK. Cancer Statistics Review. *J. Natl Cancer Inst*, Bethesda. **1998**
- 41 Chu, KC.; Tarone, R.; Kessler, L.; et al. Recent Trends in US Breast Cancer Incidence. Survival and Mortality Rates. *J. Natl Cancer Inst*. **1996**, *88*, pp 1571-9.
- 42 Johnson, V.J.; Yucesoy, B.; Luster, MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine*, **2004**, *27*, pp 135-141.

- 43 Lazarus, R.; Vercelli, D.; et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunological Reviews*, **2002**, *190*, pp 9–25.
- 44 Ranade, K.; Chang, MS.; Ting, Ch.T.; et al. High-Throughput Genotyping with Single Nucleotide Polymorphisms. *Genome Res.*, **2001**, *11*, pp 1262-1268.
- 45 Ucisik-Akkaya, E.; Dorak, M. T. A study of natural killer cell lectin-like receptor K1 gene (KLRK1/NKG2D) region polymorphisms in a European population sample. *Tissue Antigens*, **2008**, *73*, pp 177–183.
- 46 Bagos, P.G. Meta-analysis of haplotype-association studies: comparison of methods and empirical evaluation of the literature. *BMC Genetics*, **2011**, *12*, pp 1-16.
- 47 Shi, M. M. Enabling Large-Scale Pharmacogenetic Studies by High-Throughput Mutation Detection and Genotyping Technologies. *Clinical Chemistry*, **2001**, *47*, pp 164–172.
- 48 Zolezzi, S.I. et al. Análisis de la diversidad genómica en las poblaciones mestizas mexicanas para desarrollar medicina genómica en México. PNAS Early Edition.
- 49 Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. *Inmunobiología de Janeway*, Séptima Edición, Mc Graw Hill: México, D.F., 2009
- 50 Organización Mundial de Salud [www.who.int](http://www.who.int) (consultado el 2013)
- 51 Centro Nacional de Información Biotecnológica [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (consultado el 2013)
- 52 Ramírez-Bello, J. et al. Polimorfismos de un solo nucleotide (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas *Gaceta Médica de México*, **2013**, *149*, pp 220–8.

## ANEXO 1

### **Reactivos**

<u>Buffer de Lisis 1</u>	Concentración final
GibcoBRL, Grand Island, NY. USA)	0.3M
Tris HCl 2M (IBI Scientific, Peosta, Iowa USA)	10mM
MgCl <sub>2</sub> (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA)	5mM
Triton 100x (Packard, Zurich Switzerland)	1%
dH <sub>2</sub> O	
<u>Buffer de Lisis 2</u>	Concentración final
NaCl (Productos Químicos Monterrey, Monterrey N.L. México)	0.075M
Na-EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA)	0.024M
dH <sub>2</sub> O	500mL
<u>TBE</u>	Concentración final
Tris Base (USBiological, Boston's North Shore USA)	0.89M
Ácido Bórico (J.T. Baker, Xalostoc, México)	0.89M
EDTA (J.T. Baker, Phillipsburg NJ. USA)	0.5M

Para los siguientes reactivos se realizó la dilución correspondiente para llegar a la concentración requerida.

SDS 20% (IBI, Shelton Scientific, Peosta, Iowa USA.)

NaClO<sub>4</sub> 5M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA.)

NaCl 5M (Productos Químicos Monterrey, Monterrey N.L. México)

Etanol 70% (J.T. Baker, Xalostoc, México)

## ANEXO 2

### Q-PCR (*Applied Biosystems StepOne™, Genotyping Experiments*)

La reacción en cadena de la polimerasa amplifica más de un millón de veces un fragmento de DNA obtenido a partir de una región seleccionada de genoma conociendo la secuencia que lo conforma, para esto la técnica utiliza dos oligonucleótidos sintéticos de 15-30 nucleótidos que son complementarios a las zonas que flanquean la región a amplificar. Estos oligonucleótidos actúan como cebadores para la síntesis in vitro de DNA, la cual está catalizada comúnmente por una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C).

A dicha temperatura la enzima es capaz de mantener una extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en G-C. La temperatura óptima a la cual actúa la Taq polimerasa permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los cebadores y para la extensión, de esta manera se incrementa el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los cebadores unidos inespecíficamente al DNA.

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases como se muestra en la figura:

Desnaturalización: El DNA se somete a una temperatura de 95°C para separar la doble cadena a través de la ruptura de los puentes de hidrógeno con el fin de que el DNA se encuentre en forma de cadena sencilla

Alineamiento: Una vez que el DNA se desnaturaliza la temperatura desciende hasta un intervalo de entre 40-60°C, a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el DNA, y aquellas uniones más estables durarán mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas bases más, los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases estabilizan más la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso.

La temperatura de fusión ( $T_m$ , “melting temperatura”) es específica para los primers. La longitud de los primers y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación.

Elongación: Se suele realizar a 72°C y en ella los primers se extienden mediante una DNA polimerasa, utilizando el DNA diana como molde, continuando así la síntesis de los fragmentos de DNA a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado, realizándose entre 30 y 50 ciclos en cada reacción.



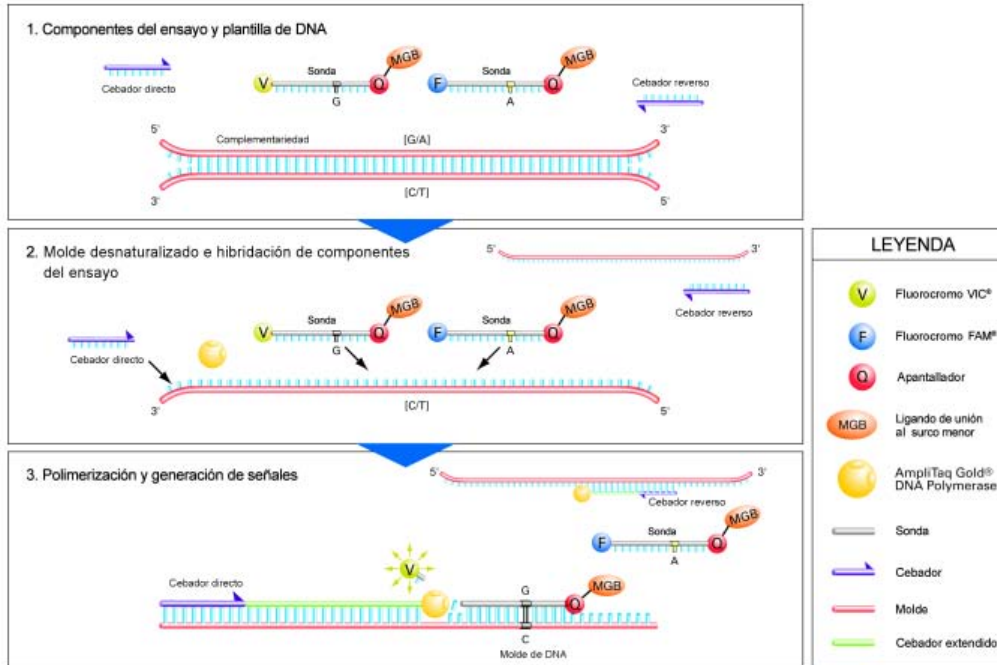


Figura. PCR en tiempo real. La figura es una ilustración esquemática del ensayo de la Nucleasa 5' durante la PCR.