



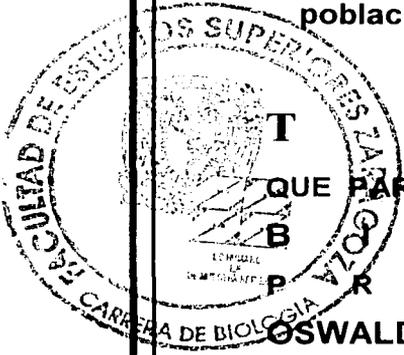
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGIA

**Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Oncología**

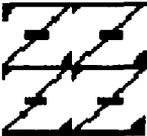
“Identificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa de ADN) de los exones mas Polimórficos del gene MICA (MHC class I chain related gene-A) en dos poblaciones indígenas mexicanas”



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B O L O G O
P R E S E N T A:
OSWALDO PARTIDA RODRIGUEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCON**

**ASESORA:
DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**



**Lo Humano Es el Eje
de Nuestra Reflexión**

MEXICO, D.F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN Y LA ASESORÍA DE LA DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por su apoyo y confianza depositados para llevar a cabo este proyecto.
- A la Dra. Martha Legorreta Herrera por el préstamo de equipo y reactivos, así como por su valiosa asesoría en las técnicas empleadas.
- Al Dr. Gilberto Vargas Alarcón del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por la donación de las muestras de ADN indígena.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Oncología de la UIDC y C por las facilidades otorgadas para la realización de las prácticas.
- A los sinodales del jurado por su valiosa contribución al trabajo.
 - Dr. Carlos Bautista
 - Dr. Edelmiro Santiago Osorio
 - Dra. Isabel Soto Cruz
 - Dr. Alberto Monroy
- Al Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en proyectos de investigación (PROBETEL) de Fundación UNAM por el apoyo económico brindado por un periodo de doce meses.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

- *A todos mis profesores de la carrera de Biología, por transmitir sus conocimientos y experiencia.*
- *A todos mis amigos, por las muchas anécdotas agradables que hemos compartido.*
- *A mi familia, en especial en memoria de mi abuelo Macario Rodríguez Martínez.*
- *A mi madre y mi hermano, por su apoyo incondicional y constante.*
- *A Miriam, por su cariño, apoyo, ayuda y motivación para continuar el esfuerzo.*
- *A la FES Zaragoza UNAM, por permitirme obtener una educación gratuita de la más alta calidad.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
EI MHC	3
Los genes del MHC de clase I	5
Los genes MIC	6
Características Moleculares	7
Polimorfismo de los Genes MIC	11
Tipos Celulares donde se expresan	12
Asociación de MICA con Enfermedades Autoinmunes, Inflamatorias e Infecciosas	14
PCR	15
Fundamentos	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVOS	21
METODOLOGÍA	22
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	59
BIBLIOGRAFÍA	60
APÉNDICES	66

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN

Recientemente se descubrió la familia de genes MIC (Major histocompatibility complex class I Chain related genes) cercana al locus HLA-B, compuesta por los genes MIC-A, B, C, D, E, F y G. Sólo MICA y MICB codifican para transcritos de ARNm y sus estructuras son muy semejantes entre sí. Aunque estos genes sólo poseen una similitud del 19, 25 y 35% respectivamente con los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de las moléculas del MHC clase I, se ha postulado que sus proteínas se pliegan de manera semejante a estos. Sin embargo MICA y MICB no se asocian con $\beta 2$ -microglobulina, ni con linfocitos CD8⁺ y probablemente no presenten péptidos en su superficie. No obstante, se ha demostrado que el producto de MICA es reconocido por una subpoblación de células T intestinales por lo que se cree que puede estar involucrado en la vigilancia inmunológica del intestino. Además se ha relacionado a MICA con enfermedades inflamatorias en asociación con el HLA-B o con el HLA-C. MICA es un gene altamente polimórfico, y el estudio de su polimorfismo permite conocer que poblaciones son susceptibles de padecer los padecimientos inflamatorios e infecciosos asociados con MICA. Estos estudios se han venido aplicando en poblaciones caucásicas y japonesas, y hasta el momento no se ha reportado ninguna investigación en poblaciones latinoamericanas. Actualmente se están desarrollando diversas técnicas de tipificación del polimorfismo de MICA para dilucidar la relación de sus variantes alélicas con determinadas enfermedades y poblaciones, una de ellas es el uso de sondas de oligonucleótidos (PCR-SSOP) que reconocen las variaciones en los exones más polimórficos en los diferentes alelos del gene. Las características de esta técnica la colocan como una buena alternativa para realizar estudios sobre el gene MICA en poblaciones mexicanas tanto indígenas como mestizas. Este procedimiento tiene como base la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por tanto se estableció la técnica de PCR para la amplificación independiente de los exones 2, 3, y 4, los más polimórficos del gene MICA, en muestras de las poblaciones indígenas mexicanas Nahua y Mixe. Esto se realizó empleando los primers diseñados para cada exón a partir de las secuencias de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

16 alelos descritos por Bahram y colaboradores en 1996; adecuando las concentraciones de enzima y reactivos, y variando los tiempos y temperaturas de la reacción. De esta manera se consiguió la amplificación de MICA en 20 muestras de ADN de individuos indígenas Nahuas y 13 de Mixes. El éxito relativo de la reacción de PCR fue evaluado semicuantitativamente mediante densitometría de los amplificadores en geles de agarosa. Al comparar la amplificación entre los tres exones y las dos poblaciones de muestras, no se encontraron diferencias que indicaran que el método usado es más apropiado para un determinado exón o para alguna de las dos poblaciones. Los resultados de la amplificación representan la primera fase del establecimiento de la técnica de PCR-SSOP, para el posterior estudio del polimorfismo de MICA en estas dos poblaciones indígenas; y para el análisis de la relación de las variantes alélicas de este gen con enfermedades mexicanas y la adquisición de nuevos alelos de MICA en poblaciones mexicanas por medio del mestizaje.

INTRODUCCIÓN

La tarea del sistema inmunológico es formidable. Dentro de la enorme colección de antígenos encontrados diariamente, debe eliminar los dañinos (externos y propios alterados por cáncer o infección) e ignorar los propios normales. La respuesta debe ser rápida y específica. Más aún, el sistema inmunológico debe ser extremadamente adaptable, ya que debe proveer una defensa para todos los posibles invasores incluyendo los nuevos (Jameson, 1998). Además debe responder de una manera finamente balanceada, ya que si la respuesta es demasiado ligera, pueden acaecer infecciones y cáncer; y en contraste, si es demasiado vigorosa o inespecífica, puede sobrevenir un padecimiento autoinmune.

El MHC

Desde hace varias décadas se sabe que las células del sistema inmunológico que se encargan de reconocer los antígenos son los linfocitos T. Sin embargo sólo son capaces de hacerlo cuando los antígenos están asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), y son estas proteínas las que permiten al sistema inmunológico detectar a las células del cuerpo infectadas con antígenos intracelulares (proteínas de clase I) y las células del sistema inmunológico de otras células (proteínas de clase II) (Voet y Voet, 1995).

Se cree que las moléculas del MHC aparecieron con los primeros vertebrados, específicamente con los peces mandibulados (Gnathostomata) hace unos 450 millones de años (Litman *et al.* 1999). El MHC codifica antígenos altamente polimórficos conocidos como HLA (human leukocyte antigens). El complejo de genes del HLA está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6p21.3 (Klein y Horejsi, 1997) y se extiende a lo largo de 4 Mb (Mizuki *et al.* 1997a; Shiina *et al.* 1998). Se ha establecido que la región del MHC contiene cerca de 180 genes (Shiina *et al.* 1999a) y en promedio existe un gene detectado al menos cada 30-40 kb (Mizuki *et al.* 1997; Yamazaki *et al.* 1999), los que incluyen un gran número de multicopias de genes polimórficos (Campbell y Trowsdale, 1997), y que se cree, fueron apareciendo por duplicaciones repetidas en el transcurso de la evolución (Geraghty *et al.* 1992; Leelayuwat *et al.*, 1995; Shiina *et al.* 1998; Shiina *et al.* 1999b).

La región del HLA está dividida convencionalmente en tres regiones, la clase II (1Mb), clase III (1Mb) y la clase I (2Mb) localizadas en ese orden del centrómero al telómero (Yamazaki *et al.* 1999; Lydyard *et al.* 2000).

Los antígenos de clase I y clase II están involucrados en el control genético de las respuestas inmunes al desarrollar oligopéptidos antigénicos para el receptor $\alpha\beta$ de las células T; lo que conforma una interacción importante para contrarrestar invasiones microbiológicas, controlar la proliferación de células malignas y determinar el éxito de transplantes (Shiina *et al.* 1999a). La región III contiene

genes que son componentes del complemento (Klein y Horejsí, 1997 Shiina *et al.* 1999b).

Los genes del MHC de clase I

Las moléculas de clase I se expresan en virtualmente cada célula nucleada y restringen el reconocimiento de péptidos antigénicos por las células T CD8⁺ (Jameson, 1998). La región de clase I se extiende a lo largo de 2Mb y expresa 6 genes de clase I, de los cuales el HLA-A, -B y -C codifican moléculas polimórficas presentadoras de antígenos. El papel fisiológico del HLA-E y -F permanece incierto (Geraghty *et al.* 1992), sin embargo el HLA-G puede tener una función específica en la interfase materno-fetal. Además, el MHC contiene varios pseudogenes y fragmentos de genes de clase I (Shiina *et al.* 1999b).

Las moléculas HLA de clase I, HLA-A, -B y -C (Figura 1), son heterodímeros compuestos por una glucoproteína de membrana polimórfica de 44-kDa codificada por el HLA, conocida como cadena pesada o cadena α , y por $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$) una proteína no polimórfica codificada fuera del MHC, ligada de manera no covalente a la porción extracelular de la cadena pesada. La región extracelular de la cadena α puede ser dividida en tres dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), cada uno con aproximadamente 90 aa, y el polimorfismo en la cadena α está localizado en las regiones hipervariables de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Jameson, 1998; Abbas, 1994).

Es de gran interés que muchas enfermedades, como la enfermedad de Behcet, espondilitis anquilosante, la psoriasis vulgaris, la salmonela, la colitis ulcerante, la artritis de Takayasu, la enfermedad de Buerger, la enfermedad de Basedow y

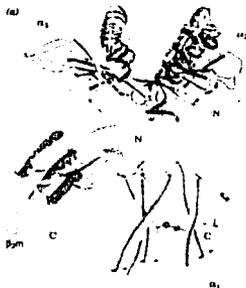


Figura 1. Estructura tridimensional de la molécula del MHC de clase I donde se observan la cadena pesada formada por los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, asociada a la β -2 microglobulina (β_2m) (Voet y Voet, 1995).

muchas otras enfermedades infecciosas han sido relacionadas estrechamente con alelos particulares del HLA clase I (Mizuki *et al.* 1997; Shiina *et al.* 1999b).

Los genes MIC

La búsqueda de nuevas secuencias codificadoras en la región cercana al locus HLA-B para dilucidar la asociación entre el HLA-B27 con enfermedades reumatóides e inflamatorias condujo al descubrimiento de una nueva familia, los genes MIC (major histocompatibility complex class I chain-related genes, por sus siglas en inglés), que consisten en siete miembros, MICA (PERB11.1), MICB (PERB11.2), MICC (PERB11.3), MICD (PERB11.4), MICE (PERB11.5), MICEF (PERB11.6) y MICG (PERB11.7) (Bahram *et al.* 1994; Gaudieri *et al.* 1997a; Gaudieri *et al.* 1997b; Shiina *et al.* 1999a), de los cuales sólo MICA Y MICB codifican para transcritos de ARNm, mientras que MICC, MICD, MICE, MICEF y

MICG son pseudogenes debido a que presentan varias mutaciones puntuales y deleciones (Bahram *et al.* 1994; Ando *et al.* 1997).

En contraste con el amplio conocimiento de los genes clásicos del MHC que han estado bajo intensa investigación, poco es lo que se conoce de los genes MIC. Recientemente se ha publicado su estructura (Figura 2) (Bahram *et al.* 1994) y han comenzado las investigaciones en cuanto a la regulación de su expresión, su distribución en los tejidos y su variabilidad alélica (Bahram y Spies, 1996a; Fodil *et al.* 1996; Groh *et al.* 1996).



Figura 2. Estructura tridimensional de la molécula de MICA.

Características moleculares

Los genes MICA y MICB están estrechamente relacionados y codifican para transcritos de 1382 y 2376 pares de bases (pb) respectivamente (Bahram *et al.* 1994; Fodil *et al.* 1996). La molécula de MICA es codificada por un gene muy largo (si se compara con los 3.5 kb promedio del HLA) y poco común de 11722 pb que se encuentra localizado 46.5 kilobases (kb) centromérico del locus HLA-B; también

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MICB es codificado por un gene extenso de 12930 pb que está localizado a 83 kb centromérico de MICA (Groh *et al.* 1996) (Figura 3). La organización genómica de MICA y MICB es muy similar entre sí, pero completamente diferente de otros genes de clase I (Bahram y Spies 1996a). En ambos casos un extenso intrón de 6840 pb para MICA y 7352 pb para MICB separa los dos primeros exones. Adicionalmente aparece un sexto exón de 302 pb para MICA y de 1338 para MICB que codifica para la parte citoplasmática y para la secuencia 3' no traducida (3' UT). El exceso en la secuencia 3' UT, es por lo tanto, responsable de la diferencia de aproximadamente 1 kb de longitud entre los transcritos de MICA y MICB (Bahram *et al.* 1994; Fodil *et al.* 1996). No existe prueba de alguna utilidad de estas singularidades. Como es de esperarse, el alto grado de similitud observado entre las regiones codificadoras de MICA y MICB se extiende a lo largo de ambos genes.

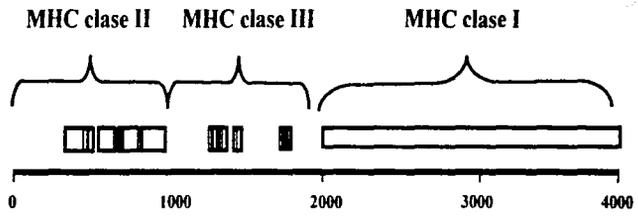
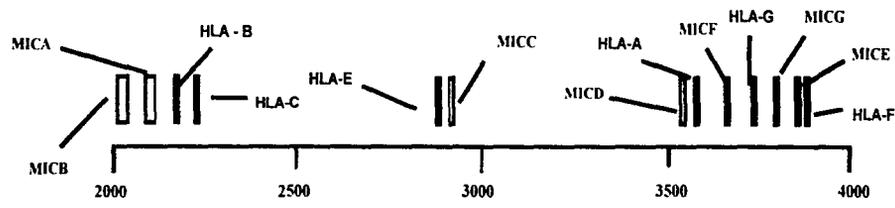
MICA codifica un transcrito de 1382 pb y MICB uno de 2376 pb, ambos con una región abierta de lectura (open reading frame) de 1149 pb, que da origen a un polipéptido de 383 aa. y 43 kDa, sin embargo, el mensajero para MICB es un poco más largo debido a su región 3'UT. Ambos genes comparten una homología mayor al 90% en sus regiones codificadoras (Bahram *et al.* 1994; Bahram y Spies 1996b).

Los genes MICA y MICB son similares en estructura, aunque si los comparamos con las moléculas del MHC clase I sólo comparten una similitud del 19%, 25% y 35% con respecto a los dominios alfa 1 ($\alpha 1$), alfa 2 ($\alpha 2$) y alfa 3 ($\alpha 3$)

respectivamente (Bahram *et al.* 1994). A pesar de ello, se ha postulado que sus proteínas se pliegan de manera semejante a las moléculas MHC clase I. La proteína madura contiene tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) precedidos de un segmento transmembranal y una cola citoplasmática relativamente corta. Además, las moléculas de MICA y MICB no se asocian con la $\beta 2$ -microglobulina para su expresión fisiológica en la superficie celular, (Li *et al.* 1999), no son reconocidas por linfocitos CD8⁺ (Bahram *et al.* 1994), sus niveles de ARNm no son afectados por interferón γ , que es un inductor clásico para las moléculas de clase I, son independientes de los transportadores TAP y muy probablemente no presenten antígenos (Bahram 2001).

MICA y MICB son los miembros más divergentes de los genes humanos del MHC clase I identificados hasta el momento, y mediante análisis de "southern blot" se ha sugerido que MIC se conserva en la mayoría de las especies de mamíferos. La excepción más ubicua es el ratón en el que no se ha detectado la presencia de esta familia de genes en su genoma, aunque se cree que posiblemente se encuentra su contraparte evolutivo que compensa su ausencia (Fodil *et al.* 1996). El análisis filogenético de MICA sugiere que este gene divergió de los demás genes del MHC clase I después de la aparición de los anfibios, pero antes de la separación de mamíferos marsupiales y placentarios (Kandil *et al.* 1995).

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



Cromosoma 6

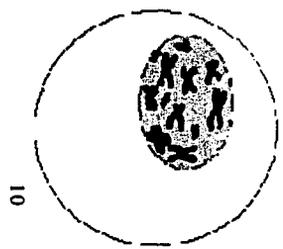


Figura 3 Localización de los genes MIC en la región del MHC clase I del cromosoma 6. Las distancias están expresadas en Kb.

Polimorfismo de los genes MIC

Los genes MICA y MICB han resultado ser altamente polimórficos (Bahram *et al.* 1996a; Bahram *et al.* 1996b; Fodil *et al.* 1999). Al principio, mediante secuenciación de líneas celulares homocigotas, se identificaron 16 variantes alélicas para el gene MICA y 5 para el gene MICB (Bahram *et al.* 1994, Bahram y Spies 1996b), posteriormente se registraron 33 alelos para MICA (Visser *et al.* 1999) y 11 para MICB (Ando *et al.* 1997), y en la actualidad se han descrito 54 alelos de MICA y 16 para MICB (Bahram 2001). Estos resultados se han derivado de las investigaciones para determinar las asociaciones de esta familia de genes con diversas poblaciones humanas, pero también, debido a su cercanía, con los genes HLA-B, ya que se ha demostrado que están asociados a éste en determinados padecimientos (Fodil *et al.* 1996).

Cabe mencionar que también existe el interés por desarrollar estrategias moleculares que puedan emplearse en estudios clínicos para tipificar a los genes MICA y MICB (Stephens *et al.* 1999) en casos en los que su determinación molecular sea indispensable para establecer algún diagnóstico debido a la asociación demostrada de estos genes con el HLA-B, o en estudios de poblaciones en los que la determinación del polimorfismo de estos genes ha sido importante para un mejor conocimiento de la evolución de las características de esa población y para estudios clínicos, entre otros. En este sentido, se ha desarrollado un sistema para tipificar a los diferentes alelos del gene MICA empleando la determinación de las secuencias del gene MICA mediante el uso de sondas de oligonucleótidos específicas (PCR-SSOP, por sus siglas en inglés). El

sistema basado en esta estrategia ha demostrado ser bastante confiable y reproducible, y a diferencia de la secuenciación directa del ADN, el tiempo de identificación se reduce considerablemente (Mendoza-Rincón *et al.* 1999; Fischer *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2001).

Tipos celulares donde se expresan

En contraste con los genes del MHC-I, los genes MIC no están expresados de forma ubicua. Inicialmente, fue postulada la expresión de los antígenos de MICA y MICB a través de la detección de su ARNm en células de origen epitelial y en fibroblastos (Bahram y Spies 1996a).

De particular interés es la demostración de que células epiteliales gastrointestinales expresan estos antígenos y que dicha expresión está regulada por la participación del promotor de proteínas de choque térmico que codifica el gene respectivo conocido como HSP70 (Fodil *et al.* 1996). Recientemente con el desarrollo de anticuerpos policlonales para MICA, que es el más polimórfico de los genes de esta familia, se ha puesto en evidencia la expresión de estos antígenos en otros tipos celulares, tanto de células normales, como de células tumorales.

Otro aspecto que llama la atención es que la expresión de MICA no se registra en células del linaje linfohematopoyético, aunque si son estimuladas con fitohemaglutinina, un activador de proliferación, se induce su expresión (Zwirner *et al.* 1998). Además se ha demostrado que la expresión de este gene no se

restringe sólo a células de tejido conectivo y epitelial, sino que también se puede inducir su expresión en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados a proliferar.

Se ha demostrado que el producto de MICA es reconocido por una subpoblación de células T intestinales que expresan el receptor V δ 1 γ/δ (Groh *et al.* 1998), por lo que se cree que puede estar involucrado en la vigilancia inmunológica del intestino, jugando un papel importante en la enfermedad injerto contra huésped (GVHD, graft versus host disease) después de los trasplantes de médula ósea, dado que el intestino es una de los principales sitios de tal padecimiento (Bahram y Spies, 1996b; Pellet *et al.* 1997).

Por otra parte, Bauer y sus colegas (1999) demostraron que hay un receptor de células NK conocido como NKG2D, de 42 kDa, que interactúa con MICA. Este receptor se expresa ampliamente en células T (CD 8⁺, α/β y γ/δ) y células NK; sin embargo se ha descubierto que este receptor no se asocia exclusivamente a MICA, ya que se expresa también en ratón, que como se ha comentado con anterioridad, es una especie que no expresa genes MIC.

Además, la elevada expresión de MICA en monocitos es considerable, lo que puede implicarla en un posible circuito de respuesta inmune donde la interacción con esta importante célula efectora contribuya a desempeñar alguna función en la que esté involucrada la molécula de MICA (Zwirner *et al.* 1998).

Asociación de MICA con enfermedades autoinmunes, inflamatorias e infecciosas.

En numerosos estudios se ha asociado a MICA con ciertas enfermedades como la espondilitis anquilosante, la psoriasis, el síndrome de Reiteris y la enfermedad de Behcet y muchas otras enfermedades inflamatorias e infecciosas (Mizuki *et al.* 1997b; Gambelunghe *et al.* 1999; Ghaderi *et al.* 1999; González *et al.* 1999; Mizuki *et al.* 1999; Wallace *et al.* 1999; Park *et al.* 2001). Incluso ha sido demostrada cierta especificidad alélica con los alelos HLA-B y HLA-C (Bahram y Spies 1996a). En todos estos padecimientos se presenta un daño en el tejido conectivo o epitelial, esto sugiere la participación de algún agente tejido específico adicional a la asociación con el HLA postulado.

Recientemente, se ha demostrado de manera independiente la asociación de la enfermedad de Behcet con MICA más que con el alelo B51 (Fodil *et al.* 1996; Yabuki *et al.* 1999). Adicionalmente, se ha detectado la presencia del gene MICA en otras enfermedades inflamatorias como la uveítis, la artritis reumatoide, las espondiloartropatías (Tsuchiya *et al.* 1998), la enfermedad de Addison y la diabetes (Touitou *et al.* 2001). De hecho, la localización de los genes MIC, su estructura y la expresión de las moléculas de estos genes en ciertos tipos celulares son una base importante para suponer cierta susceptibilidad a enfermedades dependiendo del alelo expresado. Recientemente, diversos trabajos ponen en entredicho la asociación de los alelos B52 y B54 con la enfermedad cardíaca de Takayasu, que generalmente se asumen como los componentes

principales de este tipo de enfermedad (Pellet *et al* 1997; Mendoza-Rincón *et al.* 1999).

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (polymerase chain reaction), inicialmente descrita por Kary B. Mullis en 1985 (Mullis *et al.* 1986), a la postre ganador del premio Nóbel de medicina y fisiología, es una técnica que imita la forma en que la naturaleza lleva a cabo la replicación del ADN, ya que la mayoría de los organismos copian su ADN de manera muy similar cuando se realiza el proceso biológico de la división celular. En este proceso la enzima conocida como polimerasa de ADN realiza una copia de todo el ADN presente en cada cromosoma.

Esta técnica ha sido adoptada como una herramienta esencial en la investigación gracias a que con ella se puede tomar una muestra minúscula de material genético y amplificarlo lo suficiente para ser estudiado.

Fundamentos

El ADN normalmente se encuentra como una molécula de dos cadenas en forma de hélice donde ambas cadenas son complementarias. La PCR se realiza incubando ADN muestra con los primers (segmentos cortos sintetizados de ADN de cadena sencilla que corresponden y se unen exactamente a la porción de ADN a sintetizar), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, los bloques que constituyen el

ADN), soluciones amortiguadoras con Ca y Mg y la enzima polimerasa resistente al calor (Dragon, 1998).

Al calentar la mezcla a 95° C, las cadenas de ADN se separan y desnaturalizan (Figura 4).



Figura 4. Desnaturalización del ADN

La primera parte del proceso es separar las dos cadenas de ADN de la doble hélice que se utilizarán como moldes para el copiado del ADN. Esto se consigue al calentar el vial entre 90-95°C por 30 segundos.

Los primers son oligonucleótidos complementarios a los extremos 3' y 5' del segmento de ADN a amplificar, hibridan con el sitio correcto de ADN genómico que hasta ese momento se encuentra a baja concentración (Figura 5).

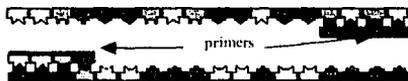


Figura 5. Alineación de los "primers"

Como los primers (oligonucleótidos especialmente diseñados) no pueden unirse a las cadenas de ADN a temperatura elevada, se necesita enfriar el vial a 55°C. Así pueden alinearse a las partes finales del ADN. Esto toma aproximadamente 20 segundos

El "primer" hibridado servirá de cebador para la síntesis de la cadena de ADN, que se inicia con los desoxinucleótidos y la polimerasa de ADN obtenida de *Thermus aquaticus* (una bacteria que habita en fuentes termales). Esta enzima (llamada *Taq polimerasa*) es capaz de extender cebadores a altas temperaturas (72°) creando de esta forma una nueva cadena complementaria para cada original (Figura 6). Cuando se completa la síntesis, la mezcla es calentada de nuevo a 95°C para desnaturalizar los dúplex de ADN recién formados.

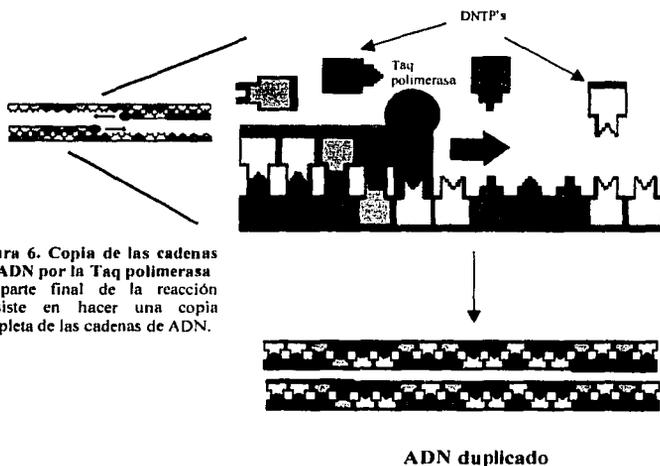


Figura 6. Copia de las cadenas del ADN por la Taq polimerasa. La parte final de la reacción consiste en hacer una copia completa de las cadenas de ADN.

Las tres etapas de la reacción de PCR: la separación de las cadenas, el alineamiento de los primers a las cadenas patrón y la síntesis de las nuevas cadenas, se realiza en apenas dos minutos. Estas tres etapas, también conocidas como ciclos son realizados en el mismo vial de reacción. Así, al final de la

reacción, la cantidad de ADN se ha duplicado. Este ciclo de desnaturalización y síntesis puede repetirse, doblando así el número de copias de la secuencia comprendida entre los primers, por lo tanto la secuencia deseada crece exponencialmente (Darnell *et al.*, 1993), de tal forma que si se empieza con una molécula, después de 30 ciclos (sólo unas pocas horas más tarde) habrá cerca de mil millones de copias, ocurriendo en cada uno una duplicación de ADN (2^{30}) (Figura 7). Lo que resulta impresionante es que para obtener esa enorme cantidad de ADN sólo se requiere de un lapso de dos a tres horas.

Donde radica la importancia de la técnica de PCR es que puede duplicarse el ADN a cantidades exorbitantes, partiendo de muestras muy pequeñas como puede ser un cabello, una gota de sangre e incluso una célula. En este sentido, si se está buscando un gene en particular, el juego cambia de "buscar una aguja en un pajar" a "crear un pajar de agujas".

Por lo anterior, la técnica de PCR se ha convertido en una herramienta poderosa en diversas ramas de la medicina, la genética y la investigación básica y clínica.

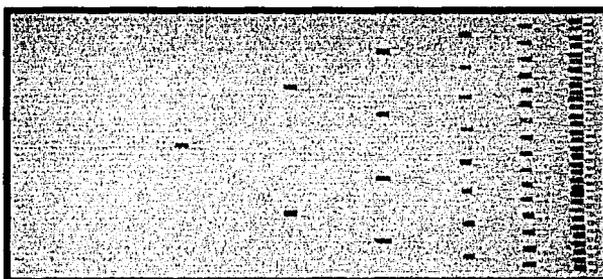


Figura 7. Crecimiento exponencial del ADN
El crecimiento exponencial del ADN blanco ocurre debido a que los productos de cada ciclo se convierten en los patrones para el siguiente ciclo

De hecho, la PCR es en la actualidad una de las técnicas de biología molecular con mayor utilidad en los laboratorios de investigación en estudios de genética, en la detección y diagnóstico de enfermedades, para analizar ADN prehistórico, y en medicina forense para ayudar a hacer identificaciones en investigaciones policíacas (Dragon, 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El gene MICA ha sido asociado con diversos padecimientos inflamatorios y autoinmunes. Estos descubrimientos derivan de estudios del polimorfismo y distribución alélica de este gene. Sin embargo, es evidente que tales investigaciones han sido llevadas a cabo principalmente en poblaciones caucásicas, y que prácticamente no hay estudios respecto a las condiciones de este gene en las poblaciones latinoamericanas dentro de la que se encuentra la mexicana.

Actualmente se están aplicando técnicas de tipificación del polimorfismo de MICA para dilucidar la relación de sus variantes alélicas con determinados padecimientos y poblaciones, tales como la secuenciación directa, que ha dado buenos resultados, pero que es difícil de aplicarla para grandes números de muestras, o la PCR-SSCP (single-strand conformational polymorphism), que permite el manejo de un número de muestras mayor, pero que es complicada de interpretar.

Una técnica empleada en forma rutinaria para tipificar los alelos de genes del MHC a partir de ADN es el uso de sondas de oligonucleótidos específicas (PCR-SSOP) que reconocen las variaciones en los exones más polimórficos en los diferentes alelos del gene. Este procedimiento permite el manejo de números grandes de muestras y es fácil de interpretar, por lo que resulta conveniente su uso para la tipificación de MICA.

El primer paso de esta técnica es amplificar de manera independiente las regiones donde se encuentren la mayor cantidad de variaciones del gene, para que sean reconocidas por sondas de oligonucleótidos específicas para dichas variaciones

De esta manera en este trabajo se pretendió establecer la primera fase de la técnica de PCR-SSOP amplificando de manera independiente los exones 2, 3 y 4 del gene MICA, que son en la actualidad los más polimórficos de los exones de este gene, en muestras de ADN de las poblaciones indígenas Nahuatl y Mixe para contribuir en el conocimiento del polimorfismo de MICA en poblaciones mexicanas. El establecimiento de esta técnica representa una herramienta básica para el posterior estudio de las variantes alélicas nativas del gene en Nahuatl y Mixe usando SSOP y para el análisis de la adquisición de alelos nuevos de MICA a causa del mestizaje y su relación con enfermedades en diversas poblaciones mexicanas.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer la fase de PCR de la técnica de tipificación PCR-SSOP, amplificando de manera independiente los exones 2, 3 y 4 del gene MICA de muestras de las poblaciones indígenas mexicanas Nahua y Mixe para la posterior tipificación de su polimorfismo mediante sondas de oligonucleótidos.

Objetivos particulares

- Amplificación de los exones 2, 3 y 4 de las muestras de las poblaciones indígenas mexicanas Nahua y Mixe.
- Uso de primers específicos para amplificar independientemente los exones 2, 3 y 4 del gene MICA.
- Establecimiento y estandarización de las condiciones de temperatura, tiempo, concentraciones de reactivos y número de ciclos que permitan la amplificación independiente de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA mediante PCR.
- Análisis del éxito relativo de la amplificación de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA en las dos poblaciones mediante densitometría.
- Almacenamiento de los productos de PCR de las poblaciones Nahua y Mixe para su eventual tipificación mediante SSOP.

METODOLOGÍA

Material Biológico

Esta investigación se llevó a cabo utilizando muestras de ADN de los grupos indígenas mexicanos Nahua y Mixe obtenidas de las regiones del Estado de México y del Estado de Oaxaca respectivamente, aportadas por el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez a cargo del Dr. Gilberto Vargas Alarcón. Las regiones de donde son originarias las muestras son representativas de estos grupos étnicos según datos del Instituto Nacional Indigenista.

Diseño de primers

Los primers para el gene MICA fueron diseñados utilizando las bases de datos EMBL/GenBank (Núm. de acceso **X92841**) donde se buscaron las secuencias tanto de los exones como de los intrones disponibles para los genes de la familia MIC. Con la información obtenida se diseñaron los oligonucleótidos para los primers, estableciendo su longitud y respectiva localización. Los primers empleados comprendieron los exones 2, 3 y 4 ya que éstas son las regiones más polimórficas identificadas hasta el momento en el gene MICA (Mendoza-Rincón *et al.* 1999) (Apéndice I).

Amplificación por PCR

Las amplificaciones mediante la técnica de PCR se realizaron en un termociclador (PTC-200, M. J. Research Watertown Massachussets) y se aplicaron condiciones similares de temperaturas y tiempos a las que se emplean para amplificar alelos de clase I. Sin embargo, se hicieron los ajustes necesarios para conseguir las condiciones óptimas para los exones 2, 3 y 4 de MICA variando las concentraciones de la enzima, de los reactivos; las temperaturas y los tiempos de cada ciclo (Figura 8).

En las amplificaciones iniciales se utilizaron 1 µg de ADN, 25 pmol de cada primer, 0.2 mM dNTPs, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM MgCl₂ y 1UI *Taq* polimerasa de ADN (Bioline, UK) en 25 µl por reacción, completando este volumen con agua MilliQ.

Para los procedimientos de PCR se utilizaron micropipetas de 10, 20 y 100µl, exclusivas para PCR, tubos de 1.5ml (Eppendorf, Westbury NY) para la mezcla maestra, tubos de 0.2 ml de pared delgada (Eppendorf, Westbury NY) y puntas para pipetas de 200, 50 y 20µl (TreffLab, Degersheim Switzerland). El material usado es nuevo y especial para este tipo de técnicas, y los ensayos fueron realizados con reactivos y condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

Electroforesis

Los productos de las reacciones fueron sometidos a electroforesis horizontal en una cámara de electroforesis Horizon 58 (GibcoBRL, Westbury NY) en geles de agarosa (GibcoBRL, Grand Island NY) al 1% en amortiguador TBE 0.5 X (Apéndice II), teñidos con 1 μ l de Bromuro de Etidio (GibcoBRL, Westbury NY) y posteriormente se analizaron en un Gel Doc (Bio-Rad) para verificar que se hubiese llevado a cabo una amplificación adecuada. El tamaño de los productos es de 499 pares de bases (pb), 512 pb y 533 pb para los exones 2, 3 y 4 respectivamente (Mendoza-Rincón *et al.* 1999).

Análisis densitométrico.

El análisis densitométrico fue llevado a cabo en los amplificadores de los geles de agarosa empleando el software de análisis densitométrico del Gel Doc (Bio-Rad) que expresa el valor de la amplificación de los exones como absorbancia o densidad óptica (D. O.) facilitando así un análisis semicuantitativo del éxito relativo de la reacción al comparar los resultados entre las dos poblaciones y los tres exones.

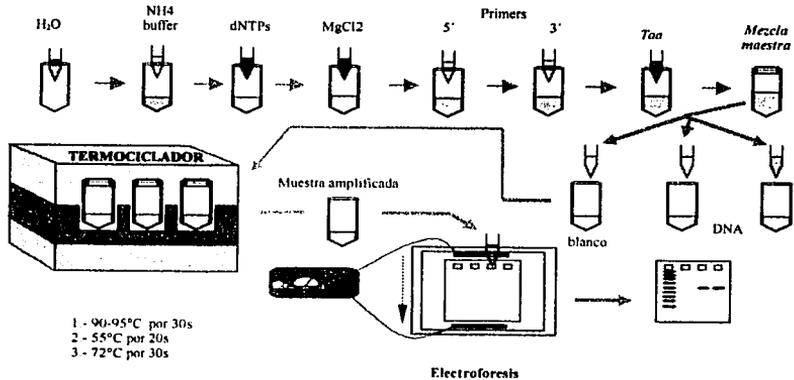


Figura 8. Procedimiento llevado a cabo para amplificar mediante PCR los exones 2, 3 y 4 de MICA. Los reactivos fueron agregados a la mezcla maestra en el orden que aparece en la figura.

RESULTADOS

Diseño de primers

Se consiguieron las secuencias de los primeros 16 alelos de MICA en las bases de datos de EMBL y GenBank (Num. de acceso **X92841**) con el fin de ubicar regiones susceptibles para diseñar primers que permitan amplificar de manera independiente los exones 2, 3 y 4 de MICA (Mendoza-Rincón *et al.* 1999). Los primers diseñados y su ubicación se muestran en la **Tabla 1** y en el **Apéndice I**.

Tabla 1. Secuencia, orientación, longitud y localización de los primers usados para las amplificaciones por PCR de MICA.

Primer	Orientación	Longitud	Ubicación	Localización*	Secuencia
MICA5'Ex2	sentido	24	Intrón 1	6826-6849	5'-TCTTGTCCCTTTGCCCGTGTGCAT-3'
MICA3'Ex2	antisentido	24	Intrón 2	7324-7301	5'-CCCCCATTCTCACCCCCAGCCTG-3'
MICA5'Ex3	sentido	24	Intrón 2	7378-7401	5'-TGGGGGAGGGCCAGGGAGGCGTAC-3'
MICA3'Ex3	antisentido	24	Intrón 3	7889-7866	5'-CGATGTGCCAACAGGAAATGCCTT-3'
MICA5'Ex4	sentido	24	Intrón 3	8227-8250	5'-CAGACTTGCAGGTCAGGGTCCCG-3'
MICA3'Ex4	antisentido	24	Intrón 4	8759-8732	5'-CAATGACTCTGAAGCACCAGCACT-3'

*La localización de los primers corresponden a las secuencias de MICA publicadas por Bahram *et al.* (1996). Los pesos moleculares esperados para los productos de PCR con estos primers son de 499, 512 y 533 pb para los exones 2, 3 y 4 respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Amplificación por PCR

Se establecieron las condiciones adecuadas de amplificación por PCR de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA utilizando las muestras de ADN de Nahuas y Mixes. Después de varios ensayos de amplificación, se llegó a las siguientes condiciones de temperaturas y tiempos.

Tabla 2. Condiciones de PCR para los exones 2, 3 y 4 de MICA.

Paso	Temperatura ⁰ C	Tiempo
1 (desnaturalización)	95	4 min.
2 (desnaturalización)	95	30 s
3 (alineamiento)	65	50 s
4 (duplicación)	72	30 s
5	repetir pasos 2 - 4, 32 veces	
6 (extensión)	72	8 min.
7	15	1 hr.

Estas condiciones permitieron la amplificación independiente de los tres exones más polimórficos de MICA en 20 de las 54 muestras disponibles de ADN Nahua: 1, 3, 8, 9, 13, 15, 18, 19, 20, 23, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 44 y 46. En las Figuras 9, 10 y 11 se pueden observar los productos de algunas de estas muestras en geles de agarosa representativos.

Y en las siguientes 13 de las 28 muestras de ADN Mixe:

1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 16, 17, 21, 30 y 48 (Figuras 12, 13 y 14).

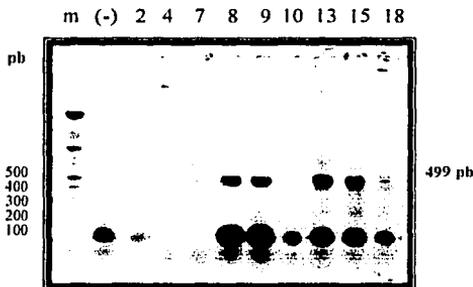


Figura 9. Amplificación del exón 2 de MICA de ADN Nahua. Gel de agarosa al 1% representativo donde fueron separadas mediante electroforesis horizontal las muestras amplificadas del exón 2. Las bandas de 100 pb se deben a contaminación en los reactivos.

Figura 10. Amplificación del exón 3 de MICA de ADN Nahua. Gel de agarosa al 1% donde se representan algunas de las muestras amplificadas separadas mediante electroforesis horizontal del exón 3.

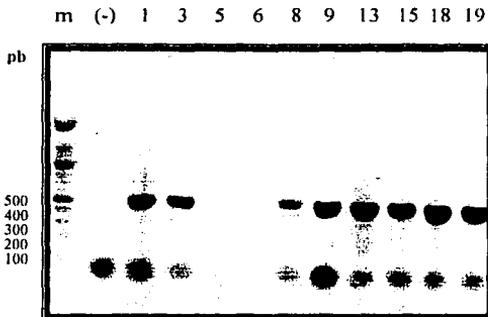
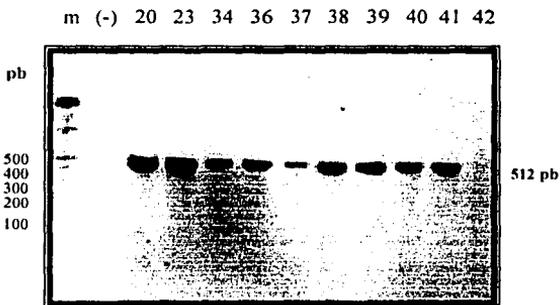


Figura 11. Amplificación del exón 4 de MICA de ADN Nahua. Gel de agarosa al 1% donde fueron separadas mediante electroforesis horizontal algunas de las muestras amplificadas del exón 4.

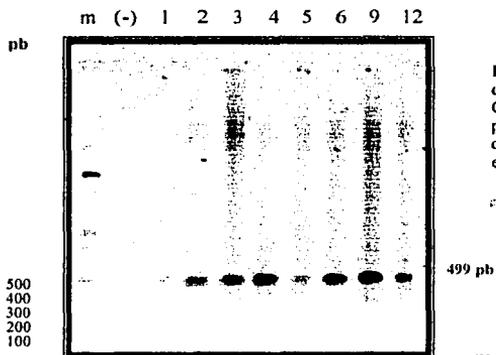


Figura 12. Amplificación del exón 2 de MICA de ADN Mixe.
Gel de agarosa al 1% en donde se presentan los amplificandos del exón 2 de MICA separados mediante electroforesis horizontal.

Figura 13. Amplificación del exón 3 de MICA de ADN Mixe.
Gel de agarosa al 1% donde fueron separados mediante electroforesis horizontal los productos de la amplificación del exón 3.

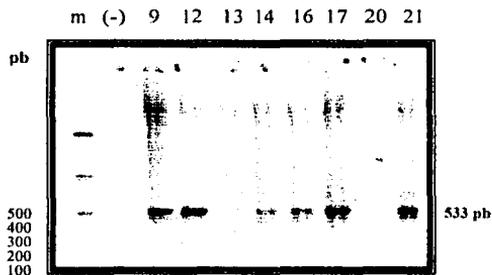
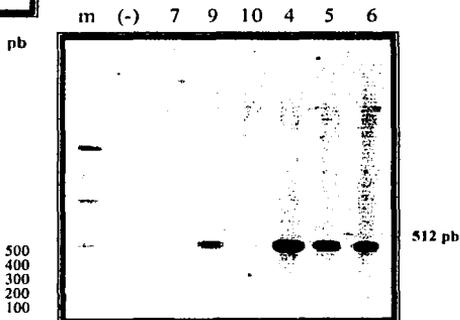


Figura 14. Amplificación del exón 4 de MICA de ADN Mixe.
Gel de agarosa al 1% representativo donde fueron separados mediante electroforesis horizontal los productos de PCR del exón 4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis densitométrico

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis horizontal en agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV. La imagen se digitalizó utilizando una cámara de video acoplada al aparato analizador de geles Gel Doc (Bio-Rad) y por medio del software del aparato se evaluó la densidad óptica de cada banda, obteniéndose los valores de absorbancia por cada exón en los pacientes Nahuas (Tabla 3).

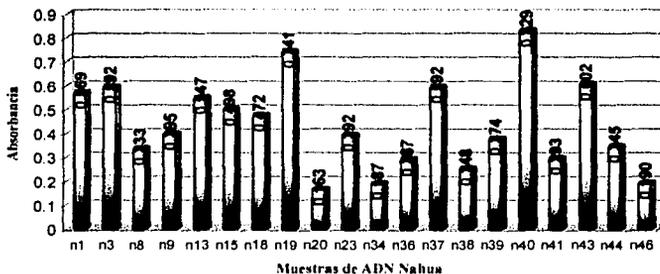
NAHUAS

Tabla 3. Densidades ópticas de las amplificaciones de los exones de MICA en Nahuas.

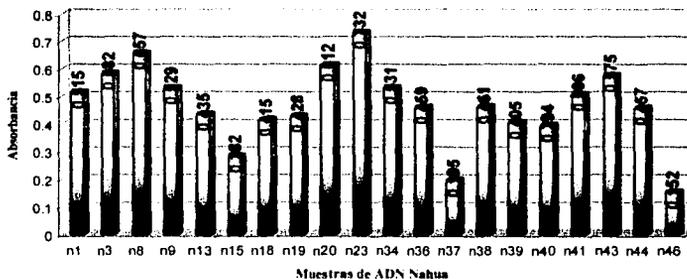
NAHUAS	Exón 2	Exón 3	Exón 4
n1	0.570	0.515	0.456
n3	0.592	0.582	0.369
n8	0.333	0.657	0.247
n9	0.395	0.529	0.425
n13	0.547	0.435	0.538
n15	0.498	0.282	0.452
n18	0.472	0.415	0.544
n19	0.741	0.428	0.467
n20	0.163	0.612	0.403
n23	0.392	0.732	0.466
n34	0.187	0.531	0.316
n36	0.287	0.459	0.429
n37	0.592	0.195	0.567
n38	0.248	0.461	0.576
n39	0.374	0.405	0.579
n40	0.829	0.394	0.874
n41	0.293	0.506	0.941
n43	0.602	0.575	0.874
n44	0.345	0.457	0.526
n46	0.190	0.152	0.246

Las densidades ópticas de los pacientes Nahuas fueron agrupados en exón 2 (Gráfica 1), exón 3 (Gráfica 2) y exón 4 (Gráfica 3).

Gráfica 1. Amplificación del exón 2 en Nahuas

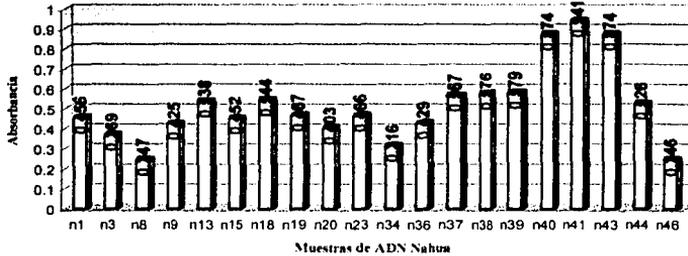


Gráfica 2. Amplificación del exón 3 en Nahuas



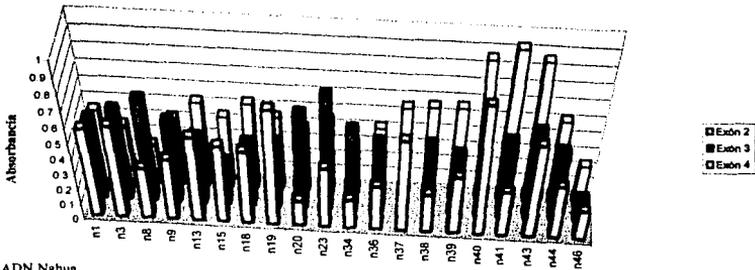
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3. Amplificación del exón 4 en Nahuas



En la Gráfica 4 se representan los valores de absorbancia de los tres exones en cada paciente Nahua.

Gráfica 4. Comparación de la amplificación de los exones más polimórficos del gene MICA en NAHUAS

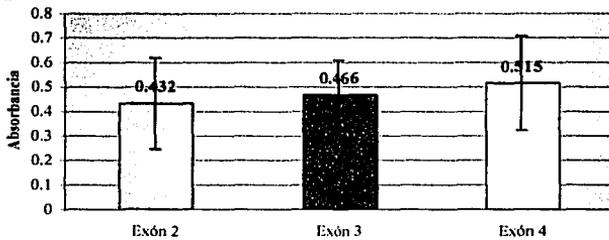


Muestras ADN Nahua

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para una mejor comprensión de la diferencia de la amplificación en los tres exones, se hizo el cálculo de las media y las desviación estándar (Gráfica 5).

Gráfica 5. Amplificación media de MICA en Nahuas



En los datos de absorbancia de esta última gráfica se puede observar que al comparar los resultados de la amplificación de los exones 2, 3 y 4 en las muestras Nahua, no se percibe una diferencia en el éxito de la reacción. Lo que indica que el procedimiento y los primers empleados fueron eficientes para amplificar independientemente los tres exones.

MIXES

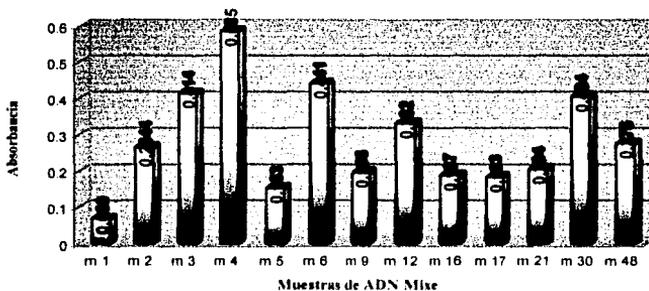
De igual manera para los pacientes Mixes se obtuvieron los valores de las densidades óptica de las ampliificaciones (Tabla 4).

Estos datos se representan por cada exón en las Gráficas 6, 7 y 8.

MIXES	Exón 2	Exón 3	Exón 4
m 1	0.069	0.364	0.198
m 2	0.264	0.645	0.200
m 3	0.414	0.096	0.655
m 4	0.585	0.662	0.260
m 5	0.153	0.424	0.471
m 6	0.441	0.384	0.701
m 9	0.196	0.085	0.323
m 12	0.332	0.224	0.388
m 16	0.187	0.475	0.208
m 17	0.183	0.416	0.345
m 21	0.204	0.448	0.294
m 30	0.404	0.447	0.573
m 48	0.276	0.405	0.162

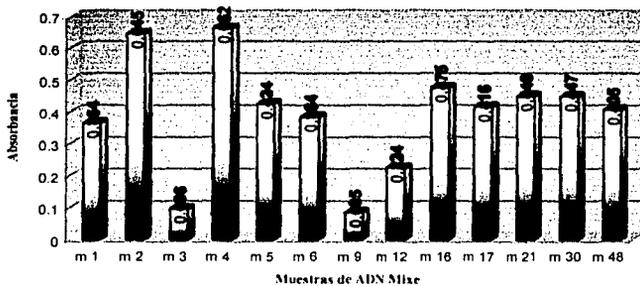
Tabla 4. Densidades ópticas de las ampliificaciones de los exones de MICA en Mixes.

Gráfica 6. Amplificación del exón 2 en Mixes

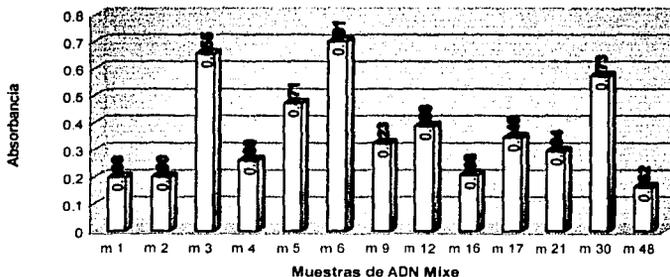


TEXTO CON
FALLA DE ORIGEN

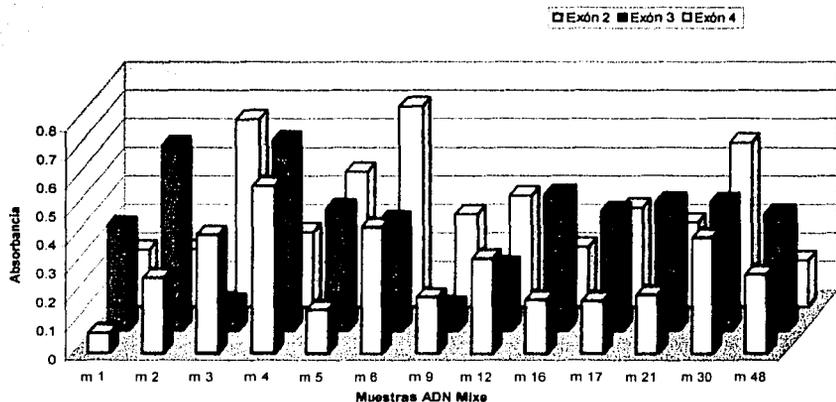
Gráfica 7. Amplificación del exón 3 en Mixes



Gráfica 8. Amplificación del exón 4 en Mixes



Gráfica 9. Comparación de la amplificación del gene MICA en MIXES

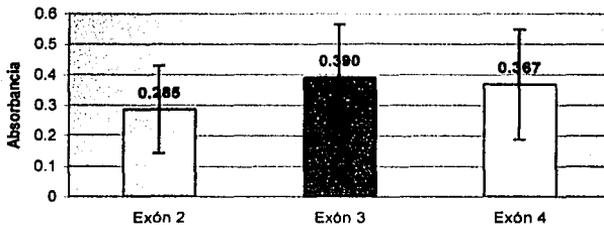


Los datos de los tres exones de MICA en las muestras Mixes se agrupan en la **Gráfica 9**.

Tal como se hizo para las muestras Nahuas, para los amplificados de pacientes Mixes se calcularon la media y las desviaciones estándar para poder comparar el grado de amplificación entre sus tres exones (Gráfica 10).

En el caso de la amplificación de las muestras Mixes, de nuevo la técnica fue satisfactoria para los tres exones y no se presentó alguna diferencia que pudiera indicar que en este grupo de muestras el procedimiento de PCR tuviera que ser modificado para mejorar la amplificación de un determinado exón.

Gráfica 10. Amplificación media de MICA en Mixes



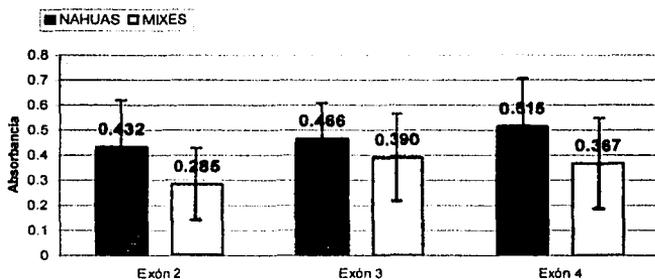
Finalmente se compararon las amplificaciones medias de los tres exones en las dos poblaciones indígenas.

En la Gráfica 11 se puede constatar que en general la técnica no presentó una diferencia observable entre la amplificación de las muestras Nahuas y las Mixes. Además, al comparar la amplificación entre los tres exones de las dos poblaciones, se puede decir que el método es eficiente para amplificar de manera independiente los exones 2, 3 y 4; lo que permite contar con las muestras para la fase de hibridación del SSOP.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estos resultados indican que las condiciones que se aplicaron para realizar las amplificaciones por medio de la técnica de PCR fueron las adecuadas y que no es necesario modificar el protocolo para conseguir amplificar un exón o una población en particular.

Gráfica 11. Comparación de la amplificación de los tres exones de MICA en Nahuas y Mixes



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En los últimos años ha habido un interés creciente en los recientemente descubiertos genes de la familia MIC. Este interés ha sido alimentado por el descubrimiento del polimorfismo del gene MICA, su relación con el HLA-B y sus aspectos funcionales. Sin embargo, el progreso en términos de detección y tipificación de MICA ha sido relativamente lento debido a la falta de una técnica de identificación apropiada. Además los estudios realizados en este campo comprenden en su inmensa mayoría las poblaciones caucásicas y japonesas y ninguno se ha enfocado hacia poblaciones mexicanas.

Hasta ahora la secuenciación directa ha sido la herramienta más empleada para la tipificación de los alelos de MICA, sin embargo, esta técnica no es aplicable para la determinación de grandes números de muestras, debido a que consta de procedimientos experimentales que requieren mucho tiempo. Recientemente, la técnica conocida como PCR-SSCP (PCR-single-strand conformational polymorphism), ha sido establecida como una técnica de tipificación más conveniente, pero tiene la desventaja de que la formación de múltiples conformaciones de ADN de cadena sencilla puede dificultar la interpretación de los patrones de bandedo (Mendoza-Rincón *et al.* 1999).

Una alternativa es la técnica llamada PCR-SSOP (PCR-sequence-specific oligonucleotide probe). Esta es una técnica rutinaria que ha sido usada para

tipificar los alelos del MHC a partir de ADN. En este procedimiento se emplean sondas de oligonucleótidos diseñadas para reconocer secuencias específicas de los genes, lo que permite identificar los diferentes alelos del gene.

Para tipificar los alelos de MICA mediante PCR-SSOP, primero es necesario amplificar mediante PCR las regiones más variables del gene, de manera que puedan ser reconocidas por las sondas. Como ya se ha comentado, dichas regiones son los exones 2, 3 y 4.

Por estas razones, en este trabajo se pretendió contribuir al estudio de MICA, al establecer una técnica de amplificación independiente de los exones más polimórficos de este gene mediante PCR en ADN de individuos indígenas de México para aportar así las bases para el desarrollo de la técnica de SSOP para la tipificación clínica del gene en poblaciones mexicanas.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa de ADN (PCR) es ampliamente usada en biología molecular y en la investigación de enfermedades genéticas para identificar nuevos genes (White 1997). Esta técnica es rápida, no muy costosa, fácil de realizar, pero donde destaca la importancia de la tecnología de la PCR es en que es única en su habilidad para localizar y amplificar exponencialmente un gene o una secuencia específica entre una gran cantidad de ADN, que por su interés clínico o de investigación sea importante amplificar para su análisis molecular, genético, inmune, patológico u otro.

En este sentido, se consiguió establecer de manera satisfactoria la amplificación independiente de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR, en muestras de los grupos indígenas Nahua y Mixe. Siendo un paso importante el diseño de los primers específicos.

La especificidad de la PCR es consecuencia del uso de oligonucleótidos diseñados para alinearse de forma precisa a una secuencia de ADN. Estos son dos secuencias cortas las cuales están separadas por una longitud de secuencia conocida y son complementarios a los fragmentos opuestos a dicha secuencia. La selección de los primers está influenciada por varios factores (Eeles y Stamps 1993; White 1993; Old y Primrose 1994; White 1997):

- Primero, los primers deben ser complementarios a fragmentos que estén un poco alejados de la secuencia a amplificar de tal manera que comiencen la amplificación un poco antes para contar con la secuencia completa.
- Segundo, obviamente cada primer debe tener una secuencia única para prevenir una alineación con una secuencia de ADN no específica.
- Tercero, deben ser de una longitud de entre 15 a 30 nucleótidos para asegurar la especificidad.

- Cuarto, debe haber una total falta de complementariedad inter-oligo, si existe alguna complementariedad entre los primers se promoverá la formación de dímeros, particularmente si ocurre cerca de los extremos 3'.
- Quinto, es necesaria una falta de complementariedad interna, pues si hay regiones complementarias dentro del primer, muy probablemente se produzcan problemas durante la PCR debido a la formación de una estructura secundaria, lo que impide la adecuada alineación.
- Sexto, si es posible, es preferible que el primer contenga alrededor de un 50% de contenido dG + dC, ya que la Guanina y la Citosina se unen más eficientemente a ADN complementario, lo que mejora la reacción.
- Séptimo, la concentración de los primers no debe ser más de 500 μM , ya que a concentraciones mayores se favorece el alineamiento no específico entre los dos primers y no con la secuencia deseada.
- Octavo, el extremo 3' del primer debe alinearse al inicio de la secuencia deseada para que la polimerización sea adecuada.

La concentración de los primers recomendada para usar es de entre 20 y 100 pmol (Old y Primrose 1994) aunque es preferible usar sólo 20 pmol debido a que no disminuye la calidad de la reacción y se ahorran reactivos (Eeles y Stamps

1993). Esta situación fue comprobada ya que la cantidad que se empleó en esta investigación fue de 25 pmol de cada primer por reacción, obteniéndose con ella buenos resultados.

Con el objetivo de diseñar los primers necesarios para la PCR y teniendo en cuenta los puntos anteriores, Mendoza-Rincón *et al.* (1999) obtuvieron la secuencia de MICA tanto de intrones como de exones (las secuencias actuales se pueden encontrar en Robinson *et al.* 2001, o en la página <http://mhc-x.u-strasbg.fr>), de tal forma que, analizando las regiones más polimórficas de los exones 2, 3 y 4, se seleccionaron las secuencias que se aprecian en la Tabla 1 y en el Apéndice I como primers. Para cada exón existen dos primers, uno sentido y otro antisentido, cada uno con una longitud de 24 nucleótidos.

Los primers usados permiten amplificar los exones para los que fueron creados, debido a que están diseñados de manera específica para las secuencias al inicio y el final de los exones. Las secuencias del gene donde se alinean los primers no presentan variaciones en los diferentes alelos de MICA hasta ahora descritos. Además, a pesar de que el gene MICA es muy polimórfico, las variaciones presentes en el gene son puntuales, de manera que la probabilidad de que exista una de ellas en la zona de alineación de los primers es muy baja, lo que permite la amplificación de todos, o de la gran mayoría de los alelos de MICA.

El amplificar de manera independiente los exones más polimórficos de MICA tiene la finalidad de obtener de manera separada las secuencias de estos exones para

conseguir un reconocimiento más claro de las variaciones en las secuencias mediante las sondas específicas. De tal manera que una sonda diseñada para determinada variación en el exón 2, no reconozca una secuencia similar en alguno de los otros exones o intrones lo que provocaría confusión en el análisis de la hibridación de la sonda.

En la reacción de PCR la principal protagonista es la polimerasa de ADN. Existen varios tipos de polimerasas que se pueden usar (Old y Primrose 1994), pero la que tiene el uso más extendido es la *Taq* polimerasa, la cual es producida industrialmente en la bacteria *E. coli* transfectada con el gene de la *Taq* polimerasa. Esta enzima es una proteína de 94 kDa con una actividad de polimerización 5'-3' que es más eficiente en un rango de temperatura de 70-80°C. Es una enzima muy termo-estable con una vida media a 95°C de 35-40 min. Lo que en términos de números de ciclos corresponde una vida media de aproximadamente 100 ciclos (White 1997). Las concentraciones recomendadas de la enzima varían entre 1 y 2.5 unidades (Eeles y Stamps 1993), y en nuestro caso se consiguió una buena amplificación con 0.75 unidades por reacción. Lo que permitió el ahorro de enzima para poder llevar a cabo un número mayor de reacciones.

Esta enzima requiere del ión magnesio como cofactor para catalizar la reacción a 72°C. El cloruro de magnesio aporta entonces este ión a la reacción, sin embargo, muchos componentes de la reacción pueden asociarse al ión magnesio, incluyendo a los primers, la propia secuencia a amplificar, los productos de PCR y

los dNTPs. Como es necesario el ión Mg libre para la enzima, la concentración total del Mg debe exceder la concentración de los dNTPs quienes son la principal competencia de la *Taq* por el ión; por ejemplo, si se usan 0.8 mM de dNTPs, se aconseja emplear 1.5 mM de cloruro de magnesio (White 1997). Sin embargo la concentración del Mg debe ser ajustada correctamente pues si se aumenta demasiado puede presentar problemas para la reacción al inhibir la enzima o al dificultar la desnaturalización del ADN y el alineamiento de los primers. Normalmente las concentraciones de Mg varían entre 0.5 y 3mM (Eeles y Stamps 1993). De este modo, para los tres exones de MICA la concentración adecuada fue de 1mM de cloruro de magnesio.

También se requiere de una solución amortiguadora que provea la fuerza iónica y la capacidad amortiguadora a un pH alrededor de 8.3 a 20°C para que la reacción se lleve a cabo (White 1997), normalmente estos "buffers" son provistos en los "kits" para PCR. Para este trabajo se usó 16 mM de buffer de PCR (NH₄)₂SO₄ de Bioline UK.

Debido a la relación que el gene MICA guarda con los genes del MHC de clase I, se decidió iniciar con un protocolo de PCR similar al que se utiliza para este grupo de genes (ver metodología). Después de algunas modificaciones experimentales, principalmente enfocadas a conseguir el ahorro de reactivos sin menguar la calidad de la reacción, se llegó a las concentraciones óptimas de los siguientes reactivos: 1µg de ADN, 25 pmol de cada primer, 0.2 mM de dNTPs, 16mM de

amortiguador de PCR $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM de MgCl_2 y 0.75 UI de *Taq* polimerasa de ADN (Bioline, UK) en un volumen total de 25 μl . Encontramos que estas condiciones fueron las adecuadas para los objetivos planteados.

Los tres pasos de la PCR son iniciados por cambios de temperatura. Las temperaturas elegidas para cada paso son cruciales para la especificidad y eficiencia de la reacción, asimismo el tiempo destinado a cada paso es determinante.

En un inicio, la mezcla de reacción debe ser calentada lo suficiente para desnaturalizar las cadenas dobles de ADN. La *Taq* polimerasa, como cualquier otra enzima, pierde actividad en una tasa que es proporcional a la temperatura. De manera que, la actividad enzimática va disminuyendo a una tasa mayor que la tasa de desnaturalización del ADN. La temperatura óptima a la cual el ADN de doble cadena se desnaturaliza en dos cadenas sencillas es de 95°C , y en la práctica se ha comprobado que 30 segundos a 2 minutos son suficientes para que se lleve a cabo de manera satisfactoria el paso de desnaturalización (Eeles y Stamps 1993). Sin embargo, es muy recomendable un paso largo inicial de desnaturalización para reducir la actividad de la polimerasa antes del comienzo. El proceso de desnaturalización adecuado al que se llegó en nuestro procedimiento fue de una temperatura inicial de 95°C durante 4 minutos, seguido de un segundo paso de 30 segundos a la misma temperatura.

Después de la desnaturalización, el ADN debe ser enfriado rápidamente para evitar que las dos cadenas se reúnan; entonces se debe llevar la mezcla a la temperatura de alineamiento. Esta temperatura depende de la secuencia de los primers y de la fuerza iónica de la solución amortiguadora usada, por lo que debe ser ajustada dependiendo de los primers empleados. Existen programas de computo que permiten determinar la temperatura adecuada dependiendo de estos factores (White 1997). De nueva cuenta, el tiempo de este paso debe ser ajustado experimentalmente, sin embargo generalmente se emplean de 30 segundos a 2 minutos (Eeles y Stamps 1993). Para los primers diseñados para los tres exones de MICA, la temperatura idónea es de 65°C y el tiempo adecuado fue de 50 segundos.

El tercer paso de la reacción es la polimerización o amplificación. La *Taq* polimerasa posee una temperatura óptima de operación de 72°C, con una capacidad promedio de incorporar unos 150 nucleótidos por segundo (Innis *et al.* 1988), de manera que esta es la temperatura usada para este paso. A pesar de ser una temperatura usualmente mayor a la de alineamiento, este aumento no desnaturaliza el complejo ADNc-primer, lo que permite continuar con la técnica (Eeles y Stamps 1993). La duración de esta etapa normalmente se encuentra entre 30 segundos y 1.5 minutos, y se incrementa con la longitud de la secuencia a amplificar (Eeles y Stamps 1993; Old y Primrose 1994). En nuestro caso 30 segundos fueron suficientes para el tercer paso debido al tamaño de las secuencias de los exones.

El escoger correctamente el número de ciclos de PCR ahorra tiempo y hace más eficiente la técnica. Si se cuenta con una cantidad relativamente abundante de ADN (100 ng) una PCR de 30 ciclos es suficiente para observar una banda muy evidente en un gel de agarosa con Bromuro de Etidio. Sin embargo, para cantidades menores el número de ciclos crece proporcionalmente (Eeles y Stamps 1993). Es preferible usar el número menor de ciclos posible, ya que al conseguir una abundante cantidad de amplificadas, se corre el riesgo de que los productos sean las que se tomen como punto de partida para el alineamiento en lugar de los primers (White 1997). Para este estudio se aplicaron 33 ciclos ya que se contaba con 1 µg de ADN por reacción, repitiendo desde el segundo al cuarto paso, esto es, desnaturalización, alineamiento y duplicación.

Es necesario mencionar que al terminar todos los ciclos es altamente recomendable darle a la mezcla un tiempo considerable de extensión a 72°C para que la enzima se encargue de terminar de polimerizar los amplificadas (Eeles y Stamps 1993; Old y Primrose 1994). Por lo que al término de los 33 ciclos se aplicó un paso de extensión de 8 minutos a 72°C.

De este modo, después de experimentos iniciales para determinar las concentraciones y temperaturas de amplificación óptimas, finalmente se llegó a las condiciones que aparecen en la **Tabla 2**.

Es conveniente aclarar que las reacciones de PCR se realizaron en un ambiente adecuado para ello, aplicando todas las precauciones encontradas en la literatura (Eeles y Stamps 1993; White 1993; Old y Primrose 1994; White 1997), de acuerdo con nuestras posibilidades, es decir que se empleó equipo dedicado exclusivamente para PCR, asimismo las reacciones se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar, con tubos de pared delgada, guantes y puntas estériles, y se aseguró de no juntar las muestras de ADN y los reactivos con los amplificadores a fin de evitar una contaminación con aerosoles de los productos de la reacción. Además, en cada ensayo se utilizó un control negativo en el que en vez de usar ADN, se agregaba agua MilliQ en el mismo volumen.

Para comprobar la obtención de una correcta amplificación se empleó la técnica de electroforesis (gr. *phoresis*=translación) en gel de agarosa. El término electroforesis se refiere al transporte de partículas a través de un solvente o una matriz, por el efecto de un campo eléctrico (González-Morán 1996). La agarosa es un polímero lineal que se extrae de algas y se adquiere como un polvo blanco que es diluido en un buffer con calor y al permitirle enfriar forma un gel mediante enlaces de hidrógeno. Previamente al enfriamiento se agrega al gel Bromuro de Etidio para su posterior análisis con luz UV. Esta matriz contiene poros cuyo tamaño depende de la concentración de agarosa referida como porcentaje de agarosa en el buffer (w / v). Los geles de agarosa normalmente se preparan en un rango de 0.3 a 3% y son empleados habitualmente en sistemas de electroforesis sumergidos en buffer. En el gel se fabrican pozos antes de que solidifique, en donde se aplicarán las muestras a analizar, empleando para ello una solución

densa, conocida como *loading buffer* que cuando se mezcla con el ADN, le da a la muestra la densidad suficiente para caer al fondo del pozo. Una vez ahí, se aplica una corriente eléctrica que hace migrar el ADN a través del gel en una tasa que es inversamente proporcional al \log_{10} del número de pares de bases, separando así las secuencias de ADN de acuerdo a su peso molecular. Este método es ampliamente usado para separar ácidos nucleicos cuando se encuentran dentro de un rango de tamaño entre 200 y 20,000 pb.

El porcentaje de agarosa es la mejor manera de controlar la resolución de la electroforesis, ya que dependiendo de su concentración serán el tamaño de los poros por donde el ADN circulará. Los geles empleados fueron hechos a una concentración de 1% pues los productos amplificados de la PCR se encuentran en un rango entre 0.5 y 5 kb, y el buffer usado para preparar los geles y correr las electroforesis fue el TBE 0.5X (Harwood 1996).

Se realizaron varios ensayos para determinar las condiciones para la adecuada observación de los amplificados y se llegó a un voltaje de 75 V durante 40 minutos, ya que fue en ese punto cuando más claramente se observaron las bandas de los exones 2, 3 y 4 de MICA, en un transiluminador de luz UV (longitud de onda de 365 nm), en relación con el marcador de peso molecular de 100 pb. Los resultados de las electroforesis se pueden contemplar en los geles representativos en las Figuras 9 a 14.

En dichas imágenes se observan los productos de la amplificación del exón 2, cuyo peso esperado es de 499 pares de bases (pb); del exón 3 de 512 pb, y del exón 4 de 533 pb.

Estos geles son una muestra de las amplificaciones que se realizaron con este método, que permitió la amplificación de los tres exones en un total de 20 muestras de ADN Nahua y 13 de ADN Mixe, cuyos números de registro se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Muestras de ADN Nahua y Mixe en las que se obtuvo la amplificación independiente del los exones 2, 3 y 4 del gene MICA por PCR.

NAHUAS	MIXES
1	1
3	2
8	3
9	4
13	5
15	6
18	9
19	12
20	16
23	17
34	21

36	30
37	48
38	
39	
40	
41	
43	
44	
46	

En algunos geles se observan algunas bandas extras de aproximadamente 100 pb, que en primera instancia se creyó eran causadas por la mala calidad de el ADN (exones 2 y 4 de Nahuas) sin embargo también en el blanco se presentaron, por lo que se aduce a los reactivos como la causa de dichas bandas. Probablemente sean los primers los generadores de las bandas, o quizás el agua usada, pues cuando se cambió el "stock" de agua MilliQ, dejaron de presentarse.

Además, en datos que no se presentan, en algunas de las muestras sólo se consiguió la amplificación de uno o dos de los tres exones, siendo imposible amplificar los exones restantes. En la mayoría de estos casos, el obstáculo fue la poca volumen de ADN disponible que impidió la conclusión de todos los ensayos, sin embargo en algunos otros posiblemente se debió a errores metodológicos.

El hecho de que, a pesar de los repetidos intentos, en algunas muestras no se haya conseguido la amplificación de algún exón en particular, pudiera indicar la presencia de un alelo nuevo en la muestra cuya variación se encuentre en la zona de unión del primer diseñado para dicho exón, aunque en este punto de desarrollo de esta investigación sólo es mera especulación que sería resuelta mediante la secuenciación de MICA en tales muestras.

Es pertinente mencionar que sólo se consideraron las muestras en las que fue posible la amplificación de los tres exones, debido a que es una condición necesaria para la fase de hibridación con las sondas en la técnica de SSOP. En las muestras Nahuas se amplificaron 20 de 54 disponibles, mientras que con los Mixes se amplificaron 13 de 28 lo que representa el 37% y el 46% respectivamente de las muestras trabajadas. Esto a causa principalmente de que muchas de estas muestras tienen varios años de almacenadas y en algunos casos el ADN se ha evaporado o degradado.

Finalmente, con el fin de determinar si el método de PCR usado es igualmente útil para los dos grupos de muestras y los tres exones, se procedió a realizar un análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los geles de agarosa. Este es un procedimiento semicuantitativo que provee una idea relativa del éxito de la amplificación. Para ello se empleó el software del Gel Doc de Bio-Rad. Los resultados obtenidos en valores de absorbancia se presentan en las Tablas 3 y 4. Estos datos son presentados en gráficas en las cuales es bastante difícil saber si existe diferencia o no (Gráficas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9). Por tal motivo se les calculó las

medias y la desviaciones estándar de manera que fueran más sencillas de analizar.

Así, en la Gráfica 5, en dónde se presentan las medias de los amplificadores de los exones 2, 3 y 4 de MICA en Nahuas, se observa que las condiciones de PCR fueron obviamente eficientes para los tres exones, y no se percibió alguna diferencia entre la amplificación de los exones 2, 3 y 4.

En este mismo sentido pero con respecto a las muestras Mixes, en la Gráfica 10 se observa un resultado similar ya que la amplificación fue satisfactoria para los tres exones.

Finalmente, al comparar las amplificaciones entre las dos poblaciones de muestras, se evidencia que en general la técnica se ajustó muy bien tanto en las muestras Nahuas y en las Mixes, ya que no se percibe una gran diferencia entre éstos y en todos los casos se puede decir que hubo una adecuada amplificación.

El método densitométrico empleado sólo sirvió para los fines de esta investigación, esto es, dar una vista preliminar y superficial del éxito de la amplificación; y sólo se usó debido a la relativa facilidad metodológica que representa. Sin embargo es claro que si se requiere conocer de manera más precisa los resultados de una amplificación y la cantidad exacta de producto, se debe echar mano a técnicas más complejas y precisas.

Debido al buen número de muestras amplificadas de forma satisfactoria, queda evidenciada la reproducibilidad de este método de PCR, situación que es fundamental si se piensa en la técnica como la base de estudios más profundos en este gene.

La amplificación independiente de los exones 2, 3 y 4 de MICA representa la primera parte del establecimiento de la técnica de PCR-SSOP que un vez concluida, servirá para tipificar de manera rutinaria los alelos de MICA, posibilitando así estudiar la relación del polimorfismo de este gene con enfermedades infecciosas e inmunológicas. Lo que le confiere utilidad en el diagnóstico clínico.

La investigación de las variedades alélicas de MICA en grupos étnicos puede generar una visión de su relación con ciertos padecimientos infecciosos e inflamatorios característicos de ciertos linajes humanos. Esto es muy importante ya que este tipo de investigaciones permite el desarrollo de técnicas clínicas de tipificación para diagnosticar enfermedades, e incluso en el caso de MICA pudiera utilizarse en el proceso de selección de donantes en trasplantes de médula ósea, ya que se le ha asociado con la enfermedad injerto contra huésped.

Hasta el momento se han realizado algunos estudios de este tipo que han generado la mayor parte de la información que se tiene de MICA. Sin embargo la inmensa mayoría se ha realizado en poblaciones caucásicas y japonesas y no se ha reportado un solo estudio en poblaciones latinoamericanas nativas o mestizas.

En México se encuentra una vasta pluriculturalidad en sus poblaciones rurales. Algunos investigadores de esta variedad estiman que existen alrededor de 56 grupos étnicos clasificados en función de sus lenguas que comprenden el 10% de los habitantes rurales del país (Vázquez-Benítez, 2001).

Estos grupos poseen un genotipo particular con variantes alélicas diferentes las poblaciones caucásicas que, al momento del mestizaje ocurrido a la llegada de colonizadores europeos, produjeron nuevas variedades presentes en las poblaciones mestizas.

Dos de estos grupos indígenas son las poblaciones Nahuua y Mixe provenientes de las zonas centro y sureste del país. Históricamente estas regiones han estado bajo un intenso proceso de mestizaje, sin embargo hay territorios donde las poblaciones indígenas se han mantenido puras.

Estudiar el polimorfismo del gene MICA en Nahuuas y Mixes puede dilucidar la relación de MICA con enfermedades infecciosas e inflamatorias propias de estas dos poblaciones; pero además, al identificar que alelos son originarios de estos grupos, ampliando este estudio en poblaciones mestizas mexicanas, se puede conocer que nuevas variantes alélicas se han producido por el fenómeno de mestizaje con poblaciones de otras regiones.

El empleo de estas dos poblaciones en este estudio debe su importancia al hecho de que, gracias a su localización geográfica, estas comunidades han estado más en contacto con las poblaciones europeas que llegaron a México durante la colonización, lo que es más útil para conocer la historia genética e inmunológica de las poblaciones mestizas mexicanas. Aunque, definitivamente sería muy valioso el extender el estudio de las variantes autóctonas de MICA en más poblaciones indígenas del país.

CONCLUSIONES

Con el desarrollo de esta investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

- ⊙ Las condiciones elegidas de reactivos, temperaturas y tiempos para la PCR resultaron ser las adecuadas para los exones 2, 3 y 4 de MICA tanto en la población Nahua como Mixe.
- ⊙ Asimismo, los primers diseñados cumplieron satisfactoriamente con su función de alineamiento para la amplificación de los exones más polimórficos del gene MICA.
- ⊙ La técnica de amplificación independiente de los exones 2, 3 y 4 de MICA es absolutamente reproducible.
- ⊙ Los exones amplificados del gene MICA en Nahuas y Mixes están listos para la siguiente etapa del proyecto que es la tipificación por medio de la hibridación de los productos con las sondas específicas de oligonucleótidos (SSOP).

PERSPECTIVAS

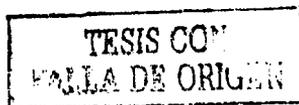
- ⊙ Concluir la técnica de PCR-SSOP para tipificar el polimorfismo de MICA en las muestras indígenas.
- ⊙ En caso de encontrar nuevos alelos, secuenciarlos para su publicación.
- ⊙ Ampliar la tipificación a muestras mestizas, en un estudio de distribución alélica poblacional de este gene en México, para conocer cuales son las variantes autóctonas y cuales se han adquirido en nuestra población por medio del mestizaje con poblaciones de otras regiones.
- ⊙ Investigar la relación de los alelos del gene MICA con diversos padecimientos inflamatorios o infecciosos presentes en poblaciones mexicanas.
- ⊙ Determinar la relación de las variantes alélicas de MICA en las enfermedades inflamatorias e infecciosas con los diferentes alelos del HLA.
- ⊙ Establecimiento de un diagnóstico clínico de manera rutinaria mediante SSOP.
- ⊙ Estudiar la expresión de MICA mediante RT-PCR cánceres epiteliales como el CaCu, de colón, estómago, esófago, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- **Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS. 1994.** Cellular and molecular immunology. 2nd ed. W. B. Saunders Company. USA.
- **Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K, Miyata Y, Wakisaka K, Bahram S and Inoko H. 1997.** Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). Immunogenetics. 46:499-508.
- **Bahram S. 2001.** MIC genes: from genetics to biology. Adv. Immunol. 76:1-60.
- **Bahram S and Spies T. 1996a.** The MIC gene family. Non- polymorphic antigen presentation molecules. Res. Immunol. 147:328-33.
- **Bahram S and Spies T. 1996b.** Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. Immunogenetics. 43:230-33.
- **Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE and Spies T. 1994.** A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:6259-63.
- **Bahram S, Mizuki N, Inoko H and Spies T. 1996a.** Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. Immunogenetics. 44:80-1.
- **Bahram S, Shiina T, Oka A, Tamiya G and Inoko H. 1996b.** Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. Immunogenetics. 45:161-2.
- **Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL and Spies T. 1999.** Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science. 285:727-9.
- **Campbell RD and Trowsdale J. 1997.** A map of the human major histocompatibility complex. Immunol. Today. 18:43.
- **Dragon, EA. 1998.** Polymerase chain reaction. Roche Molecular Systems. En: www.sciam.com.
- **Eeles RA and Stamps AC. 1993.** Polymerase chain reaction (PCR): The technique and its applications. Molecular biology intelligence unit. R. G. Landes Company. USA.
- **Fischer G, Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh SGE, Travers PJ and Madrigal JA. 2000.** Sequence-specific oligonucleotide probing

for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics*. 51:591-9.

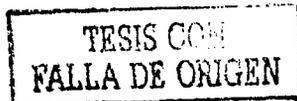
- **Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I and Bahram S. 1996.** Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics*. 44:351-7.
- **Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I and Bahram S. 1999.** MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics*. 49:557-60.
- **Gambelunghé G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P and Sanjeevi CB. 1999.** 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. Endocrinol. Metab.* 84(10):3701-7.
- **Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J; Cosman D and Dawkins RL. 1997a.** Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC. *Immunogenetics*. 45:209-16.
- **Gaudieri S, Giles KM, Kulski JK and Dawkins RL. 1997b.** Duplication and polymorphism in the MHC: Alu generated diversity and polymorphism within the PERB11 gene family. *Hereditas*. 127:37-46.
- **Geraghty DE, Koller BH, Hansen JA and Orr HT. 1992.** The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments. *J. Immunol.* 149(6):1934-46.
- **Ghaderi M, Hjelmstrom P, Hallmans G, Wiklund F, Lenner P, Dillner J and Sanjeevi CB. 1999.** MICA gene polymorphism and the risk to develop cervical intraepithelial neoplasia. *Hum. Immunol.* 60(10):970-3.
- **González S, Martínez-Borra J, Torre-Alonso JC, González-Roces S, Sánchez del Río J, Rodríguez-Pérez A, Brautbar C and López-Larrea C. 1999.** The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum.* 42(5):1010-6.
- **González-Morán MG. 1996.** Técnicas en biología celular: Teoría y práctica. AGT Editor. México.
- **Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M and Spies T. 1996.** Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:12445-50.



- **Groh V, Steinle A, Bauer S and Spies T. 1998.** Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science*. 279:1737-40.
- **Harwood AJ. 1996.** Basic DNA and RNA protocols. *Methods in molecular biology*. Vol. 58. Humana Press. USA.
- **Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH and Brow MD. 1988.** DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:9436-40.
- **Jameson JL. 1998.** Principles of molecular medicine. Humana Press Inc. USA.
- **Kandil E, Noguchi M, Ishibashi T and Kasahara M. 1995.** Structural and phylogenetic analysis of the MHC class I like Fc receptor gene. *J. Immunol*. 154(11):5907-18.
- **Klein J and Horejsí V. 1997.** Immunology. 2nd ed. Blackwell Science Ltd. UK.
- **Leelayuwat C, Pinelli M and Dawkins RL. 1995.** Clustering of diverse replicated sequences in the MHC. *J. Immunol*. 155:692-8
- **Li P, Wille ST, Bauer S, Morris DL, Spies T and Strong RK. 1999.** Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T cell ligand. *Immunity*. 10:577-84.
- **Litman GW, Anderson MK and Rast JP. 1999.** Evolution of antigen binding receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 17:109-47.
- **Lydyard PM, Whelan A and Fanger MW. 2000.** Instant notes in immunology. Bios Scientific Publishers Limited. USA.
- **Mendoza-Rincón J, Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh SGE, Fischer G and Madrigal JA. 1999.** Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing. *Immunogenetics*. 49:471-8.
- **Mizuki N, Ando H, Kimura M, Ohno S, Miyata S, Yamazaki M, Tashiro H, Watanabe K, Ono A, Taguchi S, Sugawara Ch, Fukuzumi Y, Okumura K, Goto K, Ishihara M, Nakamura S, Yonemoto J, Kikuti YY, Shiina T, Chen L, Ando A, Ikemura T and Inoko H. 1997a.** Nucleotide sequence analysis of the HLA class I region spanning the 237-kb segment around the HLA-B and -C genes. *Genomics*. 42:55-66.
- **Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S and Inoko H. 1997b.** Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong

association of six GCT repetitions with Behcet disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:1298-303.

- Mizuki M, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Ohno S and Inoko H. 1999. Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. Arthritis Rheum. 42(9):1961-6.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT and Erlich HA. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction – Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-73. (en Eeles y Stamps, 1993).
- Old RW and Primrose SB. 1994. Principles of gene manipulation: An introduction to genetic engineering. 5th ed. Blackwell Science. USA.
- Park Y, Lee H, Sanjeevi CB and Eisenbarth GS. 2001. MICA polymorphism is associated with type 1 diabetes in the Korean population. Diabetes Care. 24(1):33-8.
- Pellet P, Renaud M, Fodil N, Laloux L, Inoko H, Hauptmann G, Debre P, Bahram S and Theodorou I. 1997. Allelic repertoire of the human MICB gene. Immunogenetics. 46:434-6.
- Robinson J, Pérez-Rodríguez M, Waller MJ, Cuillerier B, Bahram S, Yao Z, Albert ED, Madrigal JA and Marsh SG. 2001. MICA sequences 2000. Immunogenetics. 53:150-69.
- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara Ch, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S and Inoko H. 1999a. Molecular dynamics of the MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(23): 13282-7.
- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N and Inoko H. 1999b. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. Immunol. Rev. 167:193-9.
- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Yamagata T, Yamagata N, Kikkawa E, Goto K, Mizuki N, Watanabe K, Fukuzumi Y, Taguchi S, Sugawara Ch, Ono A, Chein L, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Kimura M and Inoko H. 1998. Nucleotide sequencing analysis of the 146-kilobase segment around the IκBL and MICA genes at the centromeric end of the HLA class I region. Genomics. 47:372-82.



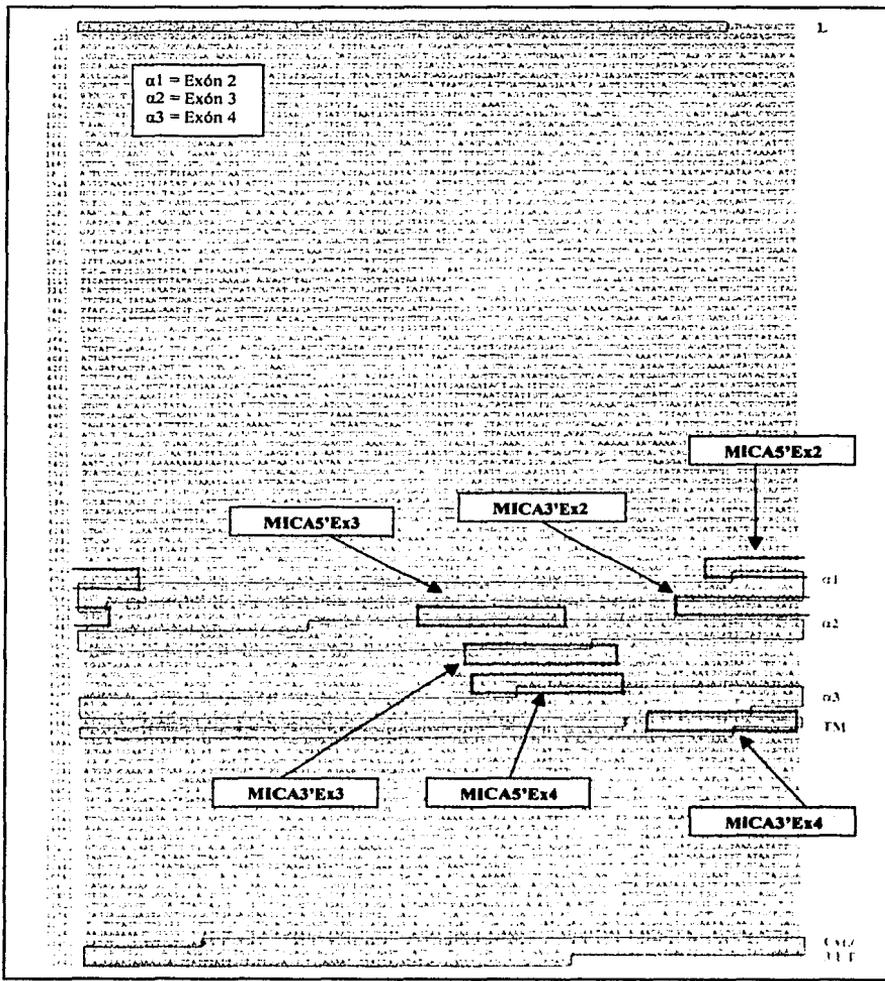
- **Stephens HA, Vaughan RW, Collins R, Kondeatis E, Theron J and Payne A. 1999.** Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphism in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens*. 53(2):167-74.
- **Touitou I, Picot MCh, Domingo C, Notarnicola C, Cattan D, Demaille J and Koné-Paut I. 2001.** The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 44(1):163-9.
- **Tsuchiya N, Shiota M, Moriyama S, Ogawa A, Komatsu-Wakui M, Mitsui H, Geraghty DE and Tokunaga K. 1998.** MICA allele typing of HLA-B27 positive Japanese patients with seronegative spondyloarthropathies and healthy individuals. *Arthritis Rheum*. 41(1):68-73.
- **Vázquez-Benítez B. 2001.** Comunicación personal.
- **Visser CJT, Tilanus MGJ, Tatari Z, Wil van der Zwan A, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R and Charron D. 1999.** Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes. *Immunogenetics*. 49:561-6.
- **Voet D and Voet JG. 1995.** *Biochemistry*. 2nd ed. John Wiley and Sons. USA.
- **Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ, Ohno S, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Yabuki K, Kondiatis E, Stephens HAF, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR and Vaughan RW. 1999.** MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behcet's disease. *Immunogenetics*. 49:613-7.
- **White BA. 1993.** PCR protocols: Current methods and applications. *Methods in molecular biology*. Vol. 15. Humana Press. USA.
- **White BA. 1997.** PCR cloning protocols: from molecular cloning to genetic engineering. Humana Press. USA.
- **Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kakalmani E, Inoko H and Ohno S. 1999.** Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behcet disease in Greece. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci*. 40(9):1921-6.
- **Yamazaki M, Tateno Y and Inoko H. 1999.** Genomic organization around the centromeric end of the HLA class I region: Large-scale sequence analysis. *J. Mol. Evol*. 48:317-27.
- **Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B and Stastny P. 2001.** Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol*. 62(6):620-31.

LIBRARY OF CONGRESS

- **Zwirner NB, Fernández-Viña MA and Stastny P. 1998.** MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endotelial cells and monocytes. *Inmunogenetics*. 47:139-48.

TRIPLOIDIA
FALLA DE ORIGEN

Apéndice I. Secuencia del alelo 0004 de MICA y localización de los primers utilizados para la amplificación de los exones 2, 3 y 4.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Apéndice II

Preparación del TBE 0.5X

TBE 5X 1L

Tris-HCl	54g
Ac. Bórico	27.5g
EDTA 0.5M pH 8	20ml

Para preparar 200ml de TBE 0.5X se disuelven 20 ml de TBE 5X en 180ml de H₂O MilliQ. Finalmente se esteriliza en autoclave.

Preparación de los geles de agarosa

Se agregan 03g de Agarosa en 30ml de TBE 0.5X y se disuelven con calor en un horno de microondas por 20 seg. Se deja enfriar un poco y se pone a solidificar en la cámara de electroforesis con los peines puestos. En 25 min. El gel está listo, entonces se sumerge en TBE 0.5X y se agregan las muestras con el búfer de carga en los pozos. Finalmente se cierra la cámara, se conectan los electrodos a la fuente de poder y se procede a la electroforesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN