

58



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"POLIMORFISMOS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I Y II EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICO UTERINO POSITIVO A VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO-16"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
M A R C O S ROMÁN PACHECO

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. TERESA JUÁREZ CEDILLO

ASESOR DE TESIS: Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÉXICO D.F.

OCTUBRE 2002





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL “HOSPITAL
DE ONCOLÓGIA DEL CENTRO MEDICO
NACIONAL SIGLO XXI ”.**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

M. en C. TERESA JUÁREZ CEDILLO

Q. B. P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS

JURADO

PRSDENTE: Q. B. P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS

VOCAL: M. en C. TERESA JUÁREZ CEDILLO

SECRETARIO: Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA

SUPLENTE: Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA

SUPLENTE: Q.F.B. ROSALVA CERVANTES CRUZ

AGRADECIMIENTOS

A dios padre, hijo y espíritu santo
Por permitirme terminar una empresa
Más en mi vida y por brindarme todo su
Amor y cariño en cada paso de mi vida

A mis padres

Ángela Pacheco y Moisés Román
Por permitirme ser siempre como he querido
Y por darme siempre su apoyo en los momentos difíciles

A mis hermanos

Elena, Rosalía, Sonia, Inés, Moisés,
Ángel, Adriana, Juan y Ruth
Por darme su apoyo y ayuda en todo
mi proceso de estudiante y como
persona

A mi directora

M en C Teresa Juárez Cedillo
Por darme la oportunidad de emprender un nuevo
proyecto en mi vida y por su cariño comprensión y paciencia

A mi asesor

Q.B.P. Gustavo Miranda Contreras
Por sus excelentes aportaciones para el mejoramiento
del trabajo.

A mis amigos

Que han sido muchos y muy buenos por inspirarme
A seguir el camino y por compartir los buenos y malos momentos juntos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis sinodales

Q.F.B. Yolanda Flores

Q.F.B. Rosalva Cervantes

Q.F.B. Francisco Javier Parada

*Por sus valiosas observaciones y ayuda para
La realización del trabajo.*

A mis profesores

*Por todos los conocimientos adquiridos durante
Mi formación y por ser lo bastante tolerante y comprensivos
Durante mi estancia en la Facultad.*

Agradezco de manera muy especial

Dra Inés Román Pacheco

*Por ser tan estricta conmigo y así permitirme lograr
Mis más grandes objetivos no solo profesionales, sino
En todos los aspectos de mi vida*

Alejandro y Gerardo

*Por llevarme de regreso a la escuela y enrolarme una
vez más al camino, ya que de no haber estado ahí en el
momento justo este trabajo no existiría.*

Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

*Por sus conocimientos, tiempo, paciencia, y comprensión
Para que este trabajo tuviera el lucimiento que es debido*

*Y a todas aquellas personas que tuvieron la amabilidad
De contribuir en la realización de este proyecto así como de su
Apoyo en forma emocional durante este largo camino*

MUCHISIMAS GRACIAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	
• EL CÁNCER CERVICO UTERINO	4
• EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	6
• EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	8
• DETERMINACIÓN GENÉTICA DE LOS POLIMORFISMOS DEL CMH	20
• ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL CMH	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	30
MATERIAL Y MÉTODO	31
DIAGRAMA DE FLUJO	42
DISEÑO ESTADÍSTICO	43
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53
APÉNDICE	59
GLOSARIO	64

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Palabras clave:

CaCu: Cáncer Cerviño Uterino

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

VPH: Virus del Papiloma Humano.

El Cáncer Cervico Uterino (CaCu) representa un problema de Salud Pública Mundial y en México es sin duda uno de los cánceres más frecuentes en 1999, la gran cantidad de estudios realizados en la búsqueda de asociaciones causales, han mostrado que existe una relación muy fuerte entre factores relacionados con comportamiento sexual y el Virus del Papiloma Humano (VPH) es el más sobresaliente como factor biológico causal de la enfermedad¹⁻⁴, las células transformadas o infectadas por VPH y el papel de la respuesta inmune pueden ser relevantes en el desarrollo o progresión de malignidad en células cervicales, ya que el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I y clase II, es importantes para la presentación de antígenos virales a los linfocitos T citotóxicos⁵⁻⁷.

Para lo cual se decidió realizar un estudio transversal descriptivo, que permitió determinar la frecuencia de los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tanto Clase I como Clase II en pacientes con Cáncer Cervico Uterino positivo para Virus del Papiloma humano tipo 16, para identificar los alelos del CMH clase I y II presentes en el desarrollo de la enfermedad, el estudio consto de 100 mujeres con CaCu positivo a VPH-16, de cualquier edad, que tengan vida sexual activa, y aceptaran la participación voluntaria del estudio además de que residan en el área metropolitana, a cada muestra se le determinaron las regiones HLA-A, HLA-B, HLA-DQ y HLA-DR del CMH, de la muestra tomada a las pacientes se utilizo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Kit de Amplicor), ya que en este estudio se halló que existe relación entre el CaCu y el VPH-16, los resultados obtenidos en la población mexicana se compararon con los reportados en otros países reflejando datos muy similares que ayudaran a su posible prevención y detección a tiempo al desarrollo del CaCu.

INTRODUCCIÓN

La prevención del Cáncer es una de los fines para el equipo de salud, ya que por el momento no se cuenta con una cura para este padecimiento, aunque ya contamos con una mejor tecnología científica, el método más eficaz de para las personas que presentan esta molestia es la detección y prevención oportuna y del desarrollo de la enfermedad.

Para las ciencias medicas el uso de nuevas metodologías, en el área de inmunogenética y la biología molecular, como lo es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y las de Hibridación nos permiten un diagnóstico más acertado, rápido y confiable para el posible desarrollo a diferentes enfermedades con la finalidad de ofrecer a los pacientes una mejor atención al desarrollo del cáncer.

En los años 30 de este siglo, Gorer & Snell estaban estudiando los antígenos de superficie de células sanguíneas, e identificaron varios grupos de genes responsables de esos antígenos, se percataron de que uno de esos grupos de genes, los cuales estaban estrechamente ligados, determinaban el rechazo de trasplantes entre distintos individuos no emparentados de la misma especie, por esta razón, denominaron a estas moléculas como antígenos de histocompatibilidad, y al conjunto de genes ligados que los codificaban complejo principal de histocompatibilidad, CMH. (Snell fue premiado con el Nobel en 1980 por este descubrimiento). El sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) se compone de varios genes alojados en el brazo corto del cromosoma 6 que codifican los aloantígenos que se expresan en la superficie de las células implicadas en el rechazo de trasplantes heterólogos; por ello se les conoce como genes y antígenos de histocompatibilidad, el término "complejo mayor de histocompatibilidad" se refiere a los genes y a las proteínas que codifican de esta región cromosómica, este sistema HLA (término internacionalmente aceptado para denominar al complejo mayor de histocompatibilidad de los humanos) está, a su vez, formado por tres regiones que producen moléculas específicas, las moléculas de clase-I, clase-II y clase-III.

Las secuencias polimórficas del ácido desoxirribonucleico (ADN) pueden dividirse en dos grandes grupos: los polimorfismo de longitud que están basados en diferente longitud de la región variable, y los polimorfismos de secuencia basados en diferencias en la secuencia nucleotídica, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad presenta un polimorfismo de secuencia, las secuencias polimórficas del CMH coinciden con la presencia o ausencia de sitios de restricción y esto permite utilizar técnicas avanzadas de análisis, basadas en la información genética (ADN) que presenta un individuo, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa, estas técnicas, denominadas genéricamente *reacción en cadena de la polimerasa* ("Polymerase Chain Reaction" o PCR), permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho invento.

Una vez realizado la PCR se procede a la hibridación de los productos, la hibridación es un proceso de unión de dos hebras complementarias de ácidos nucleicos pero cuyo origen es distinto. Una de ellas será el ácido nucleico diana y la otra será la sonda empleada para localizar ese ácido nucleico diana. Una sonda es un fragmento monocatenario de DNA o RNA marcado con una molécula reporter, y que se emplea para el reconocimiento específico de una molécula determinada de ácido nucleico diana de cadena sencilla, en un proceso de hibridación. Una de las técnicas más utilizados hoy en día es la de Transferencia del ADN a soportes sólidos (técnica de Southern) Se emplea una sonda o *probe* complementaria de la región hipervariable. Las sondas se clasifican, de acuerdo con la localización y número de sitios que presentan sus secuencias complementarias en el genoma.

Con la ayuda de estas técnicas se contara con un mejor diagnóstico , ya que nos permitirán detectar con mayor rapidez y exactitud el desarrollo del CaCu así como concebir mejor la función del CMH.

EL CÁNCER CERVICO UTERINO

El Cáncer Cervico Uterino (CaCu) es un problema de Salud Pública Mundial, corresponde a 6% de todas las neoplasias femeninas, es el cáncer más frecuente después de el de mama, en el mundo entero y el primero en América Latina, donde mueren más de 30.000 mujeres anualmente por esta patología. en E.U. se estiman en 16.000 casos nuevos de Cáncer Cervico Uterino y 5.000 muertes cada año.^{2,8,9} Los grupos más afectados son los de 45 a 64 y 65 y más, con tasas de 31.9 y 65.5 por 100,000 mujeres de sus respectivos grupos de edad.¹⁰

La mortalidad por Cáncer Cervico Uterino en el país va desde 7.9 hasta 22.6 y las entidades con los índices de mortalidad más bajos son: Zacatecas 7.9, Querétaro 9.7 y Nuevo León 9.8., los estados de mayor mortalidad son: Yucatán 22.6, Oaxaca 19.0, Nayarit 18.5, Morelos 18.2 y Veracruz 18.1¹¹, de las 4,590 defunciones registradas en el país por Cáncer Cervico Uterino, el 42.8 % fue notificado por la Secretaría de Salud y el 42.0 % por el Instituto Mexicano del Seguro Social; ambas instituciones acumularon el 84.8 % del total de los casos registrados. El ISSSTE informó 293 defunciones, que representaron el 6.4 %, mientras que en las Fuerzas Armadas ocurrieron 63 decesos, 1.4 % del total¹².

De acuerdo a la historia natural del CaCu se ha mostrado que esta precedido por una serie de lesiones celulares dentro del epitelio endocervical, estas lesiones consideradas como preinvasoras son denominadas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)^{3,4}, desde el punto de vista histológico se clasifican en tres grupos NIC1, NIC2, y NIC3, de acuerdo al grado de lesión celular dentro del epitelio^{13,14}, en 1988 un grupo de expertos, reunidos en Bethesda, propuso una descripción morfológica que permite identificar datos que sugieren infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) y las alteraciones celulares relacionadas con el desarrollo de CaCu, las cuáles fueron identificadas como Lesiones Escamosas Intraepiteliales (LEI) de bajo y alto grado⁴, actualmente no hay un acuerdo internacional sobre el uso de la nomenclatura, sin embargo, y por fortuna son equivalentes y en cada lugar ha sido adoptado alguno de estos sistemas, considerando sus ventajas y limitaciones¹⁵, se acepta que NIC3, tiene elevadas probabilidades de progresar a etapas invasoras, reportándose variaciones entre 16 a 53% mientras que para NIC1 esta tasa se reporta para regresión¹⁶⁻¹⁸, algunos autores afirman que transcurre alrededor de diez años en promedio a partir de detectarse alteraciones de bajo grado para llegar a presentarse un cáncer invasor in situ^{4,13}, de acuerdo a la edad, el pico de incidencia para NIC3 es de 35 años de edad, mientras que para el cáncer invasor es de 48 años, lo que hace evidente la progresión de la enfermedad con la edad, sin embargo la frecuencia de NIC3 y Cáncer invasor disminuye sustancialmente a los NIC1 reportados, lo que sugiere que hay un porcentaje elevado de regresión^{13-15,17,19}.

La gran cantidad de estudios epidemiológicos realizados en la búsqueda de asociaciones causales, han mostrado que existen numerosos factores de riesgo que influyen en el desarrollo del carcinoma cervical, algunos participan en forma aislada o en conjunto en la inducción de la transformación neoplásica sobre grupos de células susceptibles, otros serían cocarcinógenos y otros más actuarían activando la multiplicación de células ya alteradas con lo que se obtendría la progresión de la enfermedad^{1,2}.

Desde 1842 Rigoni-Stern ya había observado que existía mayor incidencia de cáncer en mujeres casadas que en las monjas. También se sabe que las mujeres con más de 10 parejas sexuales a lo largo de su vida han mostrado un riesgo diez veces mayor para desarrollar la enfermedad con relación a las mujeres con una sola pareja. Se ha reportado que las mujeres que inician antes de los 16 años el contacto sexual duplican el riesgo de padecer la enfermedad^{8,9}. Otros estudios realizados en mujeres monogámicas indican un mayor riesgo de cáncer en quienes tiene una pareja con comportamiento sexual considerado de alto riesgo. Entre las que se señalan el número de parejas sexuales, experiencias con prostitutas y antecedentes positivos de infección genital⁸.

El uso de anticonceptivos orales y antecedentes de multiparidad se ha relacionado con el riesgo elevado de CaCu, aunque ambos están relacionados con el comportamiento sexual, más bien se ha hipotetizado que es debido a la inducción de niveles elevados de hormonales que pueda tener un efecto inmunosupresor^{4,9}.

Algunos agentes químicos como es el tabaquismo muestran que el riesgo se incrementa en función de la cantidad y el tiempo de duración del hábito de fumar, es un factor que se ha estudiado de manera importante en la asociación con el CaCu por efecto directo de sus cancerígenos en las células epiteliales del cervix; por disminución de células de Langerhans y como facilitador de la acción neoplásica de agentes virales, los reportes no han sido consistentes, ya que hay autores que encuentran riesgos dos a cuatro veces mayor en mujeres fumadoras respecto a las no fumadoras; una relación dosis respuesta, que sugiere un efecto acumulativo respecto al tiempo de tabaquismo e incluso se ha determinado el contenido de metabolitos de nicotina en el moco cervical. Sin embargo otros autores han desechado esta posibilidad de asociación por lo que sigue siendo un tema de controversia el papel del hábito a fumar en las mujeres con Cáncer Cervico Uterino¹³⁻¹⁵.

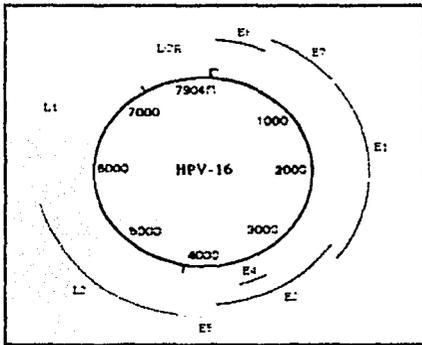
Otros hallazgos consideran a los agentes infecciosos que se transmiten sexualmente, tales como Chamydia tracomatis, Virus del papiloma Humano (VPH) y Herpes virus tipo 2 (HSV-2). Se piensa que la Chamydia tracomatis al ser un patógeno de transmisión sexual que produce cervicitis crónica de tipo folicular, puede actuar como un estímulo carcinogénico o bien intervenir en la progresión de NIC1 hacia lesiones más graves, aunque todavía continúa la controversia con respecto a su papel en la etiología de esta neoplasia^{16,17}.

EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El primer virus del Papiloma se aisló de los conejos por Richard Shope en 1933. A pesar de esto, el Virus del Papiloma Humano (VPH) seguía siendo desconocido hasta el advenimiento de la virología molecular (clonación) en los años setenta, debido a que ningún VPH crece in vitro; mucho de nuestro conocimiento viene de Virus del Papiloma de Bovino (VPB).

El VPH es un virus con genoma circular que presenta un ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, que infecta selectivamente las células epiteliales, hasta ahora no se ha podido multiplicar in vitro^{20,21}.

El VPH es un virus compuesto por 8,000 nucleótidos de ADN, cuyo genoma se ha dividido en tres regiones principales: región L (L1 y L2) que codifica para las dos proteínas que forman la cápside viral, la región temprana formada por 6 marcos de lectura (E), que contiene los oncogenes virales E1 y E2 que están involucrados en la regulación de la transcripción y la replicación viral, así como las oncoproteínas multifuncionales E6 y E7 que participan directamente en los procesos de inmortalización y transformación maligna, y una tercera región de menos de 1000 pares de bases, que controla la transcripción temprana y el origen de replicación^{22,23}.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1 Genoma del VPH-16.

Existen alrededor de 100 genotipos de VPH y aproximadamente 30 pueden afectar el tracto genital, el grado de lesión puede relacionarse con genotipos específicos de VPH, clasificando los virus de acuerdo al tipo de lesiones en los que se encuentren relacionados como sigue, según la clasificación de Schneider A.

VPH de elevado riesgo (para cáncer): genotipos 16, 18, 24, 56, 66 y 68 están relacionados principalmente con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y cáncer cervical invasivo, **VPH de riesgo intermedio**: genotipos 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59 y 60 están asociados con lesiones intraepiteliales escamosas de elevado grado pero menos frecuente a cáncer cervical invasivo y **VPH de bajo riesgo**: genotipos 6, 11, 40, 42, 43, 44 y 57 se encuentran en los condilomas acuminados y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado no en el cáncer cervical invasivo²⁴⁻²⁷.

Diagnóstico y tipificación del Virus del Papiloma Humano

La infección de Virus de Papiloma Humano (VPH) se transmite frecuentemente por contacto sexual y su prevalencia es sumamente elevada, millones de miles de infecciones por VPH ocurren cada año, el VPH esta directamente implicado en el desarrollo de condilomas y lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) siendo identificado como factor de riesgo presente en más del 90% de los casos diagnosticados con cáncer del cuello uterino²⁷.

El diagnóstico morfológico de la infección por VPH, aunque es altamente específico (cuando es realizado por expertos) tiene una sensibilidad baja, la dificultad básica ha sido la incapacidad del cultivar al virus, lo que ha impedido la producción de antígenos, antiseros y el desarrollo de sistemas serológicos clásicos, por lo tanto se han tenido que desarrollar metodologías que aplican técnicas de biología molecular para el diagnóstico de VPH basadas en la detección de Ácido dexosirribonucleico (ADN) viral específico en las muestras^{27,28}.

Se han aplicado muchas variantes en la detección de ADN Viral con cierto en muestras clínicas, por ejemplo, la Hibridación que consiste en la detección de ácidos nucleicos virales mediante fragmentos de secuencias homólogas (sondas) sintetizadas y marcadas para su detección con productos radioactivos, es un método muy específico pues utiliza fragmentos de cada tipo de VPH, inicialmente estas sondas eran marcadas con compuestos radioactivos, los cuales permiten realizar ensayos con una elevada sensibilidad y precisión, pero su desventaja es la corta vida media de los reactantes, así como los desechos radioactivos generados^{25,27,28}.

Recientemente se ha utilizado con gran éxito la amplificación de ácidos nucleicos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en esta técnica, cantidades mínimas de ADN son amplificadas exponencialmente en ciclos consecutivos de desnaturalización polimerización o hibridación y extensión hasta obtener cantidades medibles por métodos clásicos como electroforesis en geles de agarosa o ELISA^{7,29}, la especificidad genética de los reactantes garantiza una elevada sensibilidad y especificidad del sistema, las pruebas se han diseñado para detectar y tipificar los tipos más comunes de VPH lo cual tiene una gran importancia en el tratamiento de la paciente infectada³⁰⁻³², la prueba consiste en amplificar una región de ácidos nucleicos muy conservada entre todos los tipos de VPH, sin embargo, esta región presenta pequeñas variaciones entre unos tipos y otros de VPH, que pueden ser detectados al digerir el ADN amplificado con enzimas de restricción, produciéndose diferentes fragmentos que al ser separados en un gel de agarosa dan un patrón característico para cada tipo de VPH. La sensibilidad del ensayo permite detectar el patógeno en estadios tempranos, cuando el virus no ha causado transformación celular³³⁻³⁵.

EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Todas las especies de mamíferos tienen un grupo de genes estrechamente ligados y polimórficos, que fue descubierto por su implicación en el rechazo o aceptación de trasplantes o injertos de tejidos u órganos; de ahí deriva su nombre de Complejo Principal de Histocompatibilidad (CMH, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), pero obviamente, su papel fisiológico (natural) no puede ser ese (al fin y al cabo, la evolución no pudo prever que una especie - la humana- se fuera a dedicar a hacer trasplantes). Las moléculas codificadas por el CMH intervienen de un modo central en el desarrollo de las respuestas inmunes específicas, tanto la humoral como la celular^{5,6,36}.

Las moléculas del CMH juegan un papel esencial en el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T (tanto los coadyuvantes, T_H , como los citotóxicos, T_C).

El juego particular de moléculas CMH de cada individuo (determinado por el conjunto de alelos de los genes CMH que posee) influye sobre el repertorio de epítomos que pueden reconocer sus linfocitos T_C y T_H . Por ello, la capacidad de respuesta frente a los patógenos (es decir, la mayor o menor susceptibilidad a la enfermedad infecciosa) y los fenómenos de autoinmunidad dependen parcialmente de esa dotación concreta de alelos del complejo mayor de histocompatibilidad^{5,6,36}.

En los años 30 de este siglo, Gorer & Snell estaban estudiando los antígenos de superficie de células sanguíneas, e identificaron varios grupos de genes responsables de esos antígenos. Se percataron de que uno de esos grupos de genes, los cuales estaban estrechamente ligados, determinaban el rechazo de trasplantes entre distintos individuos no emparentados de la misma especie. Por esta razón, denominaron a estas moléculas como antígenos de histocompatibilidad, y al conjunto de genes ligados que los codificaban Complejo Principal de Histocompatibilidad, CMH. (Snell fue premiado con el Nobel en 1980 por este descubrimiento).

El sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) se compone de varios genes alojados en el brazo corto del cromosoma 6 que codifican los aloantígenos que se expresan en la superficie de las células implicadas en el rechazo de trasplantes heterólogos; por ello se les conoce como genes y antígenos de histocompatibilidad, el término "Complejo Mayor de Histocompatibilidad" se refiere a los genes y a las proteínas que codifican de esta región cromosómica. Este sistema HLA (término internacionalmente aceptado para denominar al complejo mayor de histocompatibilidad de los humanos) está, a su vez, formado por tres regiones que producen moléculas específicas^{5,6,36}.

Las moléculas de clase-I se expresan en prácticamente todas las células y se producen en tres *loci*, HLA-A, HLA-B y HLA-C, las moléculas de clase-II sólo se expresan en los linfocitos-B, linfocitos-T activados y en algunos monocitos, y se componen de dos cadenas (α y β) polipeptídicas que son el producto de varios genes estrechamente relacionados que, en conjunto, se conoce como región HLA-D, y las moléculas de clase-III son, entre otras, los factores B, C2 y C4 del complemento; por eso, se conoce como complejito a un

determinado haplotipo de moléculas de clase-III. Por otra parte, también se alojan dentro del sistema HLA de clase III los genes de otras proteínas relacionadas o no con la inmunidad, como el TNF α , TNF β y Hsp70^{5,6,36} (Figura 2).

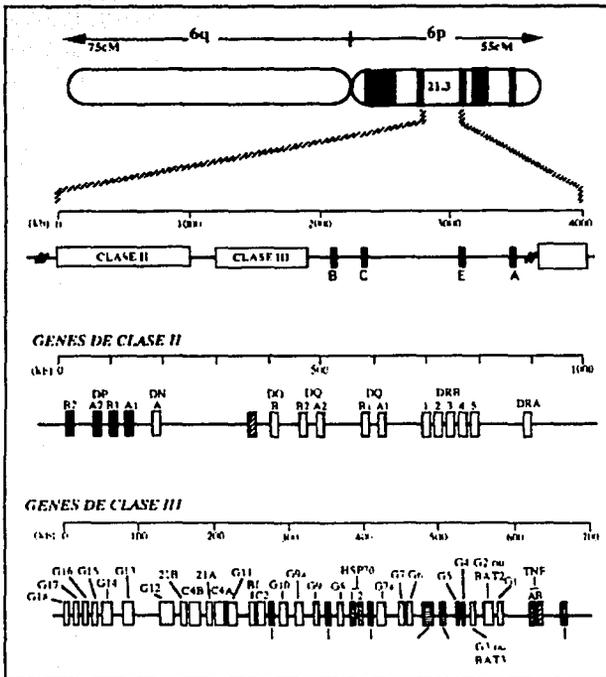


Figura 2. CMH o HLA, localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Del centrómero al telómero el sistema HLA consta de los loci de los genes de clase II, III y I. El sistema HLA de clase II comprende tres familias principales de genes, DP, DQ y DR, que codifican para los antígenos de histocompatibilidad HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, así como otros genes de función no conocida. El sistema HLA de clase III comprende los genes C2, C4B, C4A y Bf, entre otros, que codifican para ciertas proteínas del complemento. El sistema HLA de clase I se compone de los genes B, C y A, y otros de función desconocida, que codifican para sus correspondientes moléculas HLA B, HLA C y HLA A. Modificada de Billiard et al. (18).

Se han identificado varios subtipos de moléculas de clase-II. Los primeros que se reconocieron fueron los antígenos DR y posteriormente los DQ y DP, cuyos genes se alojan en subregiones homónimas del cromosoma 6.

Los genes A codifican las cadenas α y los genes B las cadenas β . La denominación de los diferentes genes sigue esta nomenclatura; por ejemplo, el gen DRB1 es uno de los 9 subtipos de genes DRB y codifica un determinado tipo de cadena β . Se ha establecido la identidad individual de cada uno de estos subtipos, y se conoce la secuencia de nucleótidos de cada una de sus respectivas cadenas.

Los genes HLA de clase-II se caracterizan por su gran polimorfismo, dado que se trata de un sistema poligénico y polialélico. Otras de sus propiedades son la transmisión codominante y la expresividad completa^{5,6,36}.

Por serología, se han identificado 24 antígenos DR, 9 antígenos DQ y 6 antígenos DP, pero gracias al uso de herramientas genéticas de mayor definición, el número de alelos conocidos es mucho mayor, todos estos genes presentan una gran homología en su secuencia de nucleótidos, y sus regiones hipervariables pueden diferenciarse en tan sólo un nucleótido.

Mientras que los linfocitos-B y los linfocitos-T activados expresan los tres subtipos de moléculas de clase-II, los antígenos DQ sólo se expresan en el 10% a 40% de los monocitos, los cuales sí expresan los antígenos DR y DP en su totalidad, estos antígenos participan en la presentación de moléculas antigénicas extrañas al organismo, pero también en el reconocimiento de moléculas propias; no en vano, los antígenos HLA de clase-II están implicados en diversas enfermedades auto inmunes. Paradójicamente, y aunque la narcolepsia sea la enfermedad con la mayor relación conocida con el sistema HLA, no se ha conseguido hasta la fecha demostrar ninguna prueba definitiva sobre la participación de la inmunidad en su fisiopatología^{5,6,36}.

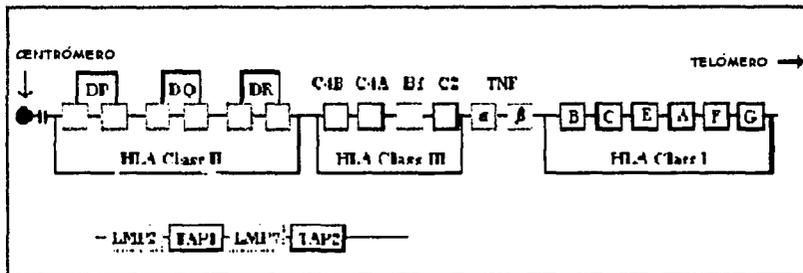


Figura 3. Mapeo genético del CMH en el cromosoma 6.

Moléculas y genes de clase-I

Las moléculas del CMH clase I constan de :

- Una cadena larga (α): glucoproteína de unos 45 kDa, polimórfica, transmembranal, codificada por los loci de tipo I en humanos *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*.
- Una cadena corta, denominada β_2 -microglobulina (β_2 -m), de 12 kDa, invariante, codificada por un gen que no forma parte del CMH.

Las moléculas del CMH Clase-I presentan a los linfocitos T_C péptidos procedentes de procesamiento de antígenos proteicos, por células del propio individuo^{5,6,36}.

Estructura de las moléculas del CMH Clase-I

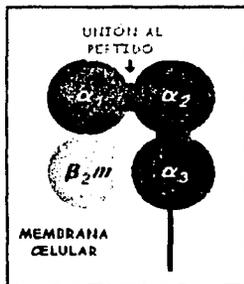


Figura 4. Estructura de la molécula clase I

La cadena α posee una cola citoplásmica (carboxi-terminal), de unos 30 aminoácidos, un segmento transmembranal hidrófobo, de unos 40 aminoácidos, y tres dominios extracelulares, cada uno de unos 90 aminoácidos: uno proximal (α_3), que es de tipo Ig, dotado de su puente disulfuro característico, y dos distales (α_2 , α_1), dotado el α_2 de un puente disulfuro.

La cadena β_2 -microglobulina posee un sólo dominio globular de tipo inmunoglobulina, y se asocia no covalentemente con el dominio α_3 de la cadena larga.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La reciente cristalización y consiguiente análisis por difracción de rayos X del complejo soluble (es decir, la porción extracelular, escindido por papaína) demuestra los siguientes detalles estructurales:

- Los cuatro dominios (tres de la cadena α y el único de la β_2 -M) interactúan dos a dos:
- Interacción $\alpha_1 - \alpha_2$
- Los dos dominios más externos (α_1 y α_2), que son polimórficos, interactúan para generar una notable estructura tridimensional: una plataforma plana formada por 8 cadenas β antiparalelas, de la que sobresalen, abarcándolas, dos largas hélices a ligeramente arqueadas. (Su aspecto se puede comparar con el de una especie de plato que soporta dos plátanos).
- Dicha estructura deja un surco profundo entre las dos hélices α que tiene unas dimensiones de 25x10x11 C. Este surco o hendidura es el sitio destinado a albergar el péptido procesado: Tiene una capacidad para péptidos entre 8 y 20 aminoácidos.
- Interacción $\alpha_3 - \beta_2$ -m:
- Estos dos dominios sólo interactúan mediante enlaces no-covalentes, siendo ambos típicos dominios globulares de tipo Ig, estabilizado cada uno por un característico enlace disulfuro intracatenario.
- El dominio α_3 está bastante conservado entre las moléculas del CMH Clase-I, y contiene una secuencia que será reconocida por la molécula CD8 de la membrana de los linfocitos T CD8⁺.
- La β_2 -microglobulina interactúa ampliamente con el dominio α_3 , y con algunos aminoácidos de α_1 y α_2 . Todas estas interacciones son necesarias para que la molécula del CMH clase-I adquiera su configuración cuaternaria adecuada para cumplir su misión.

Aparte de estas interacciones, es importante aludir al hecho de que cuando el péptido procesado se une a la hendidura de los dominios $\alpha_1 + \alpha_2$ esto favorece a su vez que el dominio α_3 interaccione correctamente con la β_2 microglobulina^{5,6,36-38}.

ESTRUCTURA DE LOS GENES DE CLASE I

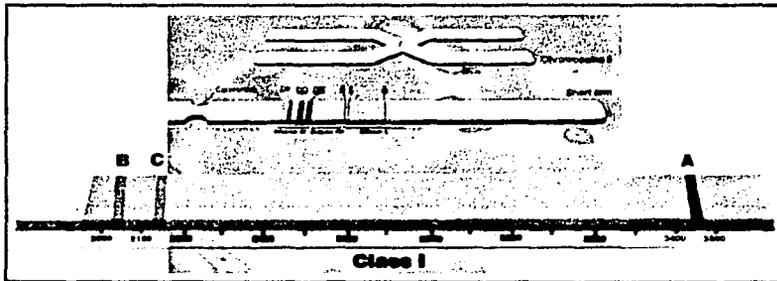


Figura 5. Ubicación de los genes del sistema HLA Clase I en el cromosoma. En su parte superior y media se muestra el cromosoma 6 y una extensión de su brazo corto indicando la región del MHC, y en su porción inferior la ubicación de los genes clase I.

Cada uno de los genes de clase I (en humanos *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) está organizado de un modo característico:

- L= exón que codifica el péptido guía
- Intrón
- exón para α_1
- intrón
- exón para α_2
- intrón
- exón para α_3
- intrón
- Tm = exón del segmento transmembrana
- IntrónC= dos exones que codifican conjuntamente la porción citoplásmica, separados por un intrón.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Unión entre el péptido procesado y las moléculas de clase-I.

En una situación fisiológica normal la hendidura de las moléculas de clase I de las células nucleadas está ocupada por péptidos procedentes del procesamiento de proteínas del propio individuo, degradadas en el citoplasma de la propia célula, si la célula es infectada por virus o es cancerosa, algunos de los péptidos propios que estaban unidos a CMH Clase-I son desplazados por péptidos procedentes de procesamiento endógeno de las proteínas alteradas, la unión entre CMH Clase-I y los péptidos no tiene la especificidad de la unión Ag-Ac, y se dice que es de tipo promiscuo:

Se ha calculado que cada célula nucleada posee unas 100.000 moléculas de los diversos tipos de CMH Clase-I. Cada variante de cada tipo reconoce unos 500 péptidos endógenos diferentes. Cuando la célula es infectada por un virus, algunos de los péptidos propios son desplazados por péptidos procedentes de procesamiento de proteínas del virus.

Una determinada molécula CMH Clase-I puede unirse con muchos tipos de péptidos diferentes; ahora bien, cada tipo concreto de CMH Clase-I y concretamente, cada variante alélica, sólo puede unirse a una gama relativamente amplia, pero limitada, de péptidos, pero no a otros^{3,6,36,39,40}, cada forma alélica de cada tipo de molécula de clase I es capaz de unirse a un "juego" característico de péptidos y no a otros, la mayoría de los péptidos que se han aislado tras separarlos artificialmente de moléculas de CMH Clase-I a los que estaban unidos son nonámeros u octámeros, pero también se pueden unir péptidos de 7 aminoácidos o de 10 aminoácidos, si bien lo hacen con 100 o 1.000 veces menor eficiencia. Cada versión alélica del CMH clase-I tiende a reconocer cierta longitud media de péptidos, y dentro de ellos, ciertos aminoácidos conservados en determinadas posiciones, los datos obtenidos por cristalografía de rayos X de co-cristales formados entre el CMH Clase-I y péptido sugieren lo siguiente:

- La hendidura del CMH Clase-I está cerrada por ambos extremos, lo que explica la limitación del tamaño del péptido admisible.
- Ambos extremos de la hendidura del CMH clase-I poseen aminoácidos conservados que interaccionan con los aminoácidos en posiciones 1,2 y 8, 9 respectivamente del péptido (y que se denominan como aminoácidos de anclaje).
- En esta situación, el péptido adopta una configuración bastante extendida (desplegada, poco compacta), en la que más del 70% está "enterrado" en el surco. Sin embargo, péptidos más largos pueden arquearse en su parte central para acomodarse mejor a la hendidura de la molécula CMH clase I.
- Dentro del surco, las configuraciones de un péptido endógeno normal y de un péptido de un virus son muy similares.
- En la cristalografía quedan moléculas de agua que interaccionan con la porción central "elevada" del péptido, lo que sugiere que esta zona es la más hidrófila y accesible, por lo que es la mejor candidata a ser la que establezca contacto con el receptor TCR del linfocito T^{36,37,38,39,40}.

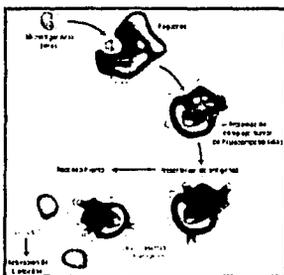


Figura 6. Secuencia de eventos involucrados en la presentación y reconocimiento de antígenos por moléculas clase I.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

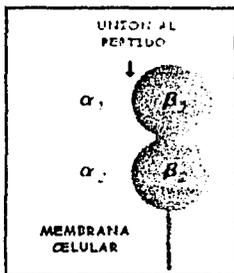
Moléculas y genes de clase II

Las moléculas del CMH clase II se expresan sólo en la superficie de células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B), y sirven para presentar péptidos procesados procedentes de antígenos exógenos a los linfocitos T CD4⁺.

humanos
DQ (α, β)
DR (α, β)
DP (α, β)

Las moléculas CMH de clase II son glucoproteínas unidas a membrana, con dominios extracelulares, segmento transmembrana y cola citoplásmica. En la siguiente tabla se muestran las formas isotípicas en humanos.

Cada molécula de clase II está formada por dos cadenas, una α y otra β que se asocian entre sí de forma no covalente.



- La cadena α tiene unos 33 kDa, y consta de dos dominios globulares (el amino-terminal, α_1 , sin puentes disulfuro, y el α_2 de tipo Ig, con su puente disulfuro), un segmento transmembrana y finalmente una cola intracitoplásmica.
- La cadena β de unos 28 kDa consta de un dominio aminoterminal (β_1 , con puentes disulfuro (pero no de tipo Ig), seguido por el dominio β_2 de tipo Ig (con puentes disulfuro), segmento transmembrana y cola intracitoplásmica.

Fig 7. Estructura de la molécula clase II.

Los dominios distales respecto de la superficie celular (α_1 y β_1) interaccionan entre sí de modo no covalente, formando la estructura que se une a péptidos derivados de procesamiento intracelular por vía endocítica de antígenos exógenos. Entre los dos forman una estructura tridimensional bastante parecida a la de los dos dominios distales de la cadena α del CMH clase-I^{5,6,36}.

- ocho plegamientos p antiparalelos que forman el "suelo" de la hendidura
- dos cadenas a -helicoidales que forman los "brazos" o paredes laterales de dicha hendidura.

Estructura de los genes de clase II

Los péptidos que se albergan en el surco de CMH clase-II son más largos que los de la clase I: de 13 a 20 aminoácidos, esto parece que se debe al hecho de que la hendidura del CMH clase-II no está tan cerrada por sus extremos, los péptidos no tienen por qué encajar entre los límites de esta hendidura, sino que pueden sobresalir de ellos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al igual que en CMH clase-I, las moléculas de clase II pueden unirse a un juego amplio pero finito de péptidos, de modo que cada variante alélica tiene una gama de péptidos a los que se engarza, cuando se cristalizó el CMH clase-II humano (1993) se vio que aparecía como dímeros del heterodímero ya citado, es decir, $\{\alpha\beta\}_2$, los dímeros están situados de modo que las hendiduras respectivas están enfrentadas^{5,6,36}.

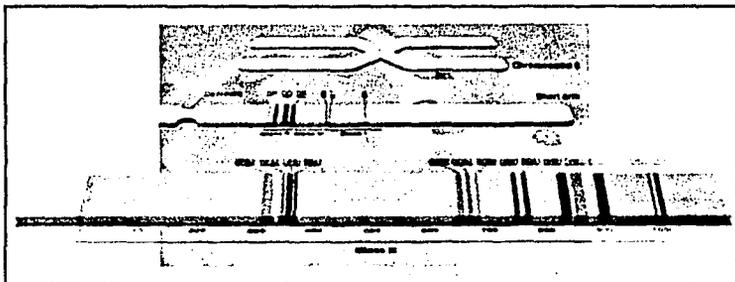


Figura 8. Ubicación de los genes del sistema HLA clase II en el cromosoma 6. En su parte superior y media se muestra el cromosoma 6 y una extensión de su brazo corto indicando la región del MHC, y en su porción inferior la ubicación de los genes clase II.

Expresión celular de las moléculas del CMH

Expresión de CMH-II

En general, aparecen moléculas de clase I en todas las células somáticas nucleadas, aunque en cantidades diversas según los tipos celulares:

- los linfocitos poseen los mayores niveles (500.000 moléculas por célula)
- menos abundantes en hígado, riñón y pulmones .
- apenas nada en cerebro y -músculo esquelético.
- nada en células de la placenta (trofoblasto vellosa).

Cada célula nucleada de un organismo sano expresa en su superficie varios tipos de moléculas del CMH e clase I, y cada uno de ellos (correspondiente a uno de los numerosos alelos posibles) se une a una gama de péptidos propios procedentes de procesamiento citosólico de proteínas normales de la propia célula.

Cuando la célula es infectada por un virus, algunos de los péptidos propios unidos a las hendiduras del CMH clase-I son desplazados por péptidos del virus igualmente procedentes de procesamiento intracitoplásmico^{5,6,36-38}.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Cada célula infectada por un determinado virus tiene varios tipos de CMH clase-I en su membrana, y cada tipo (de cada versión alélica) despliega un juego diferente de péptidos de ese virus.
- Ahora bien, otro individuo de la misma especie (dotado de otro juego diferente de alelos del CMH clase-I, es decir, de otro haplotipo) desplegará en el surco de sus moléculas de clase I un conjunto diferente de péptidos de ese virus.

Expresión de CMH-II

Las moléculas de clase II sólo aparecen en ciertos tipos de células, a saber, aquellas que funcionan habitualmente o pueden funcionar eventualmente como células presentadoras de antígenos:

- monocitos y macrófagos: en "reposo" expresan bajos niveles del CMH clase-II, pero al interactuar con el antígeno inducen altos niveles.
- células dendríticas.
- células de Langerhans de la piel.
- células B maduras.
- células T activadas

Debido a que cada molécula de clase II consta de una cadena α y otra β cada una codificada por un gen distinto de la región II del CMH, y debido a que los dos alelos de un locus del heterocigoto son codominantes, la asociación aleatoria de cadenas α y β de cada alelo puede dar origen a combinaciones de moléculas del CMH clase-II homólogas o heterólogas, esta heterozigosis en el ámbito fenotípico probablemente supone un aumento en el número de péptidos diferentes que pueden ser presentados en el sistema inmunitario de cada individuo^{5,6,36}.

Polimorfismos de las moléculas del CMH.

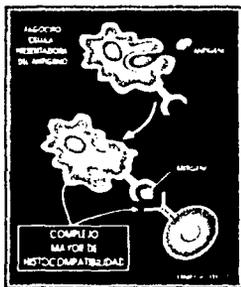
En cada especie, existe una enorme diversidad de alelos diferentes para cada locus del CMH; de hecho estamos ante el complejo de genes más polimórfico de los vertebrados.

En el caso de CMH estamos hablando de diversidad a escala poblacional, no individual, se ha deducido que deben de existir unos 100 alelos diferentes para cada locus polimórfico del CMH. Ahora bien, como estos genes están estrechamente ligados y se heredan como un haplotipo unitario, la diversidad real queda muy lejos de esta cifra, pero aún así es gigantesca. Ello crea precisamente el gran obstáculo a la hora de los trasplantes e injertos entre individuos de la misma especie, la variación entre alelos distintos de un mismo locus del CMH, a nivel de secuencia de aminoácidos del respectivo producto, es de 5 al 10%, mucho más alta que en un gen "normal", y superior incluso a la diferencia de secuencia entre algunos genes homólogos de especies distintas, la variación se concentra sobre todo en los dominios más distantes^{5,6,36,37,39,40}.

¿Cómo se genera y mantiene en las poblaciones de vertebrados este notable polimorfismo? La respuesta a esta pregunta aún no se ha respondido totalmente, pero parecen existir varios mecanismos:

1. Recombinación homóloga entre alelos del mismo locus. Parece ser que existen ciertos "puntos" para la recombinación en ciertas partes del CMH.
2. Conversión génica: Una secuencia de un alelo de un locus del CMH se ve reemplazada en parte por otra secuencia de un gen homólogo. Este gen homólogo no tiene que pertenecer al mismo locus, y ni siquiera tiene que ser un gen funcional; se ha visto que como donadores de la conversión pueden intervenir algunos pseudogenes que existen dentro del complejo.
3. Mutaciones puntuales, que introducen frecuentemente aminoácidos diferentes a los originales, pero no hay una mayor tasa de mutación, el CMH parece bastante antiguo, existiendo alelos tan viejos que sobreviven de una especie a otra.

Los aminoácidos variables entre las distintas versiones alélicas se localizan (en referencia ahora a la estructura tridimensional) en la hendidura que sirve para unirse al péptido. Esto parece sugerir que son precisamente estas diferencias alélicas las responsables de las diferencias observadas en la capacidad de diversas versiones de moléculas del CMH de responder a determinados péptidos y no a otros.



El alto grado de polimorfismo del CMH es una respuesta evolutiva para optimizar la protección de las especies de vertebrados frente a los distintos y variados microorganismos patógenos^{5,6,36-38}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Reconocimiento y presentación de antígenos por parte de moléculas clase II.

El CMH en la susceptibilidad a enfermedades

La importancia adaptativa del polimorfismo CMH en una población es que tiende a proteger a la especie frente a agentes infecciosos, ya que amplía la variedad de antígenos que se pueden reconocer. Cuando por alguna circunstancia disminuye el grado de polimorfismo del CMH, aumentan los riesgos de enfermedades infecciosas en las poblaciones, en ciertos casos se ha llegado a determinar qué alelos son los responsables de la susceptibilidad o resistencia.

En humanos se conoce un caso bien datado históricamente: en 1845 emigró a Sudamérica un grupo de 50 familias holandesas, con sólo 367 individuos, a las dos semanas de su

llegada habían muerto el 50% a causa de fiebres tifoideas, a los 6 años sucumbió un 20% adicional por la fiebre amarilla, los sobrevivientes se casaron entre sí (en vez de hacerlo con los autóctonos de la región, que hubiera "vigorizado" genéticamente al grupo). Los descendientes actuales se caracterizan por mostrar un repertorio muy limitado de haplotipos, seleccionados respecto de la media de haplotipos de los holandeses de los Países Bajos⁴¹⁻⁴⁴, en regiones del sureste de China y en Papúa- Nueva Guinea un 60% de la población humana lleva el alelo HLA-A11, en estas poblaciones, muchas cepas del virus de Epstein-Barr han mutado un epítipo que originalmente era presentado de forma dominante por HLA-A11, pero ahora los péptidos mutantes del virus ya no se unen a esta forma alélica de CMH- I, por lo que ya no son reconocidos por los linfocitos T.

Así pues, el polimorfismo de cada locus dentro de poblaciones normales hace que las poblaciones resistan el ataque de gran variedad de patógenos, aunque algunos individuos dotados de alelos poco aptos para determinado parásito puedan verse afectados⁴⁵⁻⁴⁸, en determinadas áreas geográficas donde permanentemente existen determinados parásitos, la presión selectiva puede hacer que se seleccionen aquellos alelos CMH más eficientes para presentar péptidos: en el oeste de África, donde la malaria es endémica, es muy abundante el alelo HLA-B53, que está asociado a una mayor supervivencia ante el parásito⁴⁹⁻⁵¹.

CMH clase I y autoinmunidad

Las asociaciones más conocidas que existen entre la expresión de ciertos antígenos de histocompatibilidad Clase I y algunas enfermedades autoinmunes son las que se han observado entre el HLA-B27 y la espondilitis anquilosante o el síndrome de Reiter, las personas que poseen este antígeno de histocompatibilidad Clase I también tienen un riesgo relativo de presentar una artritis reumatoide juvenil o alguna artritis secundaria a causa de una infección por Yersinia, sin embargo, en estos dos últimos casos la asociación es mucho menos significativa que la observada en las personas con espondilitis⁵²⁻⁵⁵.

El riesgo que tienen los individuos portadores del alelo HLA-B27 ha promovido estudios para identificar los familiares que portan el mismo gene, antes de que la enfermedad se presente, con el fin de proporcionarles algunas medidas profilácticas, así como el consejo genético más prudente. Algunos especialistas en este campo opinan que, si se conoce la expresión de ciertos alelos, en algunos casos, se puede calcular el pronóstico de varias enfermedades y la clase de respuesta que el paciente puede tener cuando se le aplican algunos tratamientos. Existe una larga lista de enfermedades autoinmunes que tienen cierto grado de asociación con la posesión de algún o algunos antígenos de histocompatibilidad, sin embargo, a pesar de larga lista anterior, las asociaciones encontradas hasta ahora han sido incompletas, esto quiere decir que se ha comprobado la existencia de personas sanas que poseen alelos de alto riesgo y, por el otro lado, se ha observado el caso de pacientes que tienen todos los síntomas clásicos de una enfermedad autoinmune y que, sin embargo, no expresan el antígeno de histocompatibilidad asociado a ese padecimiento, así por ejemplo, un 90% de los enfermos con espondilitis anquilosante llevan en sus células el antígeno HLA-B27, pero solamente un 20% de las personas que tienen ese antígeno desarrollan la enfermedad⁵²⁻⁵⁵, en relación a los pacientes con espondilitis anquilosante, se ha observado que los anticuerpos preparados contra los antígenos de ciertas cepas de Klebsiella, dan una

reacción cruzada con el HLA-B27 de las células de los enfermos. Se puede suponer que si estas personas se infectan con esas bacterias, podrían formar autoanticuerpos dirigidos contra un antígeno de histocompatibilidad Clase I que está presente en todas las células del cuerpo.

En muy pocos casos se han encontrado personas que poseen dos o tres alelos de alto riesgo, pero un mismo alelo ha sido asociado con cuadros clínicos diferentes como, por ejemplo, la diabetes juvenil dependiente de insulina, la dermatitis herpetiforme y la enfermedad celíaca.

Algunos HLA Clase I han sido tipificados en las células de personas con enfermedades que no son autoinmunes y que, aparentemente, no tienen ninguna relación con un trastorno del reconocimiento del material antigénico por parte del sistema inmunológico, por ejemplo, las personas con el HLA-A2 tienen cierto riesgo de nacer con malformaciones cardíacas congénitas. En estos casos se ha propuesto que ellas pudieron tener infecciones por virus teratogénicos y que esto pudo estar facilitado por el haplotipo del MHC. En otras asociaciones ha resultado mucho más difícil encontrar explicaciones razonables⁵²⁻⁵⁵.

CMH clase II y autoinmunidad

La mayoría de las enfermedades autoinmunitarias se acompañan de un aumento significativo del número de linfocitos T que tienen sobre su membrana las moléculas de histocompatibilidad Clase II, sin embargo, conviene tener presente que existen varias circunstancias fisiológicas (como la edad neonatal, el envejecimiento o el embarazo) que, a través de diferentes mecanismos, pueden modificar la capacidad de las células linfoides para expresar esta clase de moléculas.

Por otra parte, en algunas personas se ha observado que, bajo ciertas condiciones estimulantes que propician la producción de interferones, varias células epiteliales o endoteliales pueden adquirir la capacidad de expresar sobre sus membranas las moléculas HLA de Clase II, cuando esto sucede, las células que adquieren HLA Clase II se convierten, potencialmente al menos, en células capaces de presentar los determinantes de cualquier material antigénico, propio o extraño. Además, lo hacen en tejidos donde, bajo condiciones normales, ese evento no hubiera ocurrido, la situación anterior ha sido interpretada como un fenómeno facilitador de la activación de células autorreactivas y, consiguientemente, podría dar lugar a la aparición de enfermedades autoinmunitarias como la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves (hipertiroidismo), la diabetes tipo I insulino-dependiente, la cirrosis biliar primaria y la artritis reumatoide⁵²⁻⁵⁵.

En otras circunstancias, inducidas o no en una forma experimental, se ha observado un fenómeno completamente opuesto al anterior, así por ejemplo, en los linfocitos de algunos pacientes inmunodeficientes, las moléculas de histocompatibilidad Clase II se pueden encontrar disminuidas o completamente ausentes, todas estas observaciones parecen sugerir que, para la modulación de la respuesta de anticuerpos, el haplotipo contenido en el CMH humano debe ser tan importante como los cambios que pueden presentarse en el momento de su expresión.

Por otra parte, al estudiar los HLA-DR de personas sanas y compararlos con los de pacientes con una diabetes insulino-dependiente que tienen los mismos HLA-DR, se ha encontrado que existen diferencias en la codificación que trae el ADN para la síntesis de las cadenas beta de esos antígenos de histocompatibilidad Clase II. el significado biológico de estas diferencias no está claro, pero se ha sugerido que ellas pueden ser las responsables de que algunas personas produzcan autoanticuerpos contra ciertos antígenos propios⁵²⁻⁵⁵.

Principales enfermedades autoinmunitarias asociadas con la posesión de algunos alelos CMH clases I y II.

- Espondilitis anquilosante [B27]
- Enfermedad de Reiter [B27]
- Diabetes juvenil [DR3, DR4]
- Esclerosis múltiple [A3, B7, DR2]
- Miastenia gravis [B8, DR3]
- Hipertiroidismo [B8, DR3]
- Dermatitis herpetiforme [B8, DR3]
- Enfermedad celiaca [B8, DR3, DR7]
- Artritis reumatoide [B27, DR4]
- Lupus eritematoso sistémico [B8, DR3]
- Narcolepsia [DR2].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETERMINACIÓN GENÉTICA DE LOS POLIMORFISMOS DEL CMH

Las secuencias polimórficas del ácido desoxirribonucleico (ADN) pueden dividirse en dos grandes grupos: los polimorfismos de longitud que están basados en diferente longitud de la región variable, y los polimorfismos de secuencia basados en diferencias en la secuencia nucleotídica. El Complejo Mayor de Histocompatibilidad presenta un polimorfismo de secuencia, las secuencias polimórficas del CMH coinciden con la presencia o ausencia de sitios de restricción y esto permite utilizar técnicas avanzadas de análisis, basadas en la información genética (ADN) que presenta un individuo, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Estas técnicas, denominadas genéricamente *reacción en cadena de la polimerasa* ("Polymerase Chain Reaction" o PCR), permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos, esta técnica fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho invento⁶⁶, para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan

como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*, dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquáticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 °C), a esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C⁵⁴⁻⁵⁷.

La temperatura optima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los primers y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al ADN⁵⁷⁻⁶¹.

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

Desnaturalización

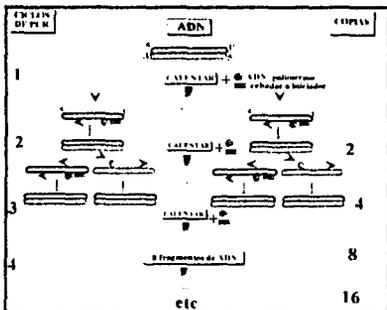
Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas, para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos, si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión.

Hibridación

Esta fase se denomina también fase de "annealing" o de emparejamiento, una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar.

Extensión

Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada, la temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad, normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 9. Secuencia de pasos en la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL CMH

Hibridación:

La hibridación es un proceso de unión de dos hebras complementarias de ácidos nucleicos pero cuyo origen es distinto, una de ellas será el ácido nucleico diana y la otra será la sonda empleada para localizar ese ácido nucleico diana.

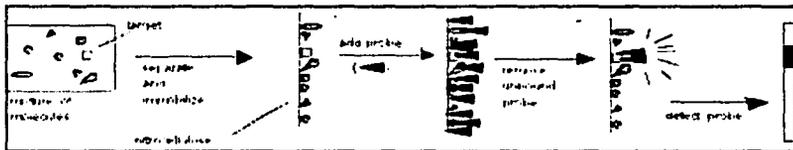


Fig. 10 Esquema de una hibridación

Una sonda es un fragmento monocatenario de ADN o ARN marcado con una molécula reporter, y que se emplea para el reconocimiento específico de una molécula determinada de ácido nucleico diana de cadena sencilla, en un proceso de hibridación⁶².

Existen tres tipos de sonda de ácidos nucleicos:

- Fragmentos de ADN
- Fragmentos de ARN
- Oligonucleótidos sintéticos u oligosondas.

Las Reporter son moléculas químicas unidas a la sonda y que van a permitir la detección de esta tras un proceso de hibridación, existen moléculas reporter de muchos tipos: radiactivas (32P, 35S), de afinidad (Biotina, Digoxigenina...), enzimáticas (Fosfatasa, Peroxidasa ...) y quimioluminiscentes (ésteres de acridina)⁶².

Factores que afectan la sensibilidad y especificidad de la reacción de hibridación son:

- Concentración del ácido nucleico diana
- Complementariedad sonda-ácido nucleico diana
- Concentración de la sonda.
- Longitud de la sonda
- Actividad específica de la molécula reporter.
- Condiciones de hibridación (pH, fuerza iónica, temperatura de hibridación, ...)
- Tm
- Acceso al ácido nucleico diana.
- Formato de hibridación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los formatos de hibridación son:

- **Hibridación en solución:** La sonda y el ácido nucleico diana se encuentran en una solución líquida. Las condiciones de hibridación deben ser rigurosas. La velocidad de formación del duplex en estas condiciones es alta. El problema de este tipo de hibridación es la eliminación de la sonda que no ha reaccionado, empleándose entre otros métodos la nucleasa S1-precipitación con tricloroacético o la hibridación protection assay^{62,63}.
- **Hibridación en fase sólida:** El ácido nucleico diana o bien la sonda se encuentran inmovilizados en filtros. Estos pueden ser de nitrocelulosa (fijación por calor) o de nylon (fijación por luz ultravioleta). Una vez realizada la fijación se añade la sonda marcada que buscará su secuencia complementaria en el ácido nucleico diana que queremos identificar. La sonda que no reacciona, híbridos inestables o uniones inespecíficas son eliminados mediante lavados. Su sensibilidad es menor que la hibridación en solución. Actualmente también se ha conseguido fijar los ácidos nucleicos al plástico de las placas de microtitulación. Existe un tipo de hibridaciones en fase sólida que son muy empleadas en Biología Molecular: los Southern blot (ADN cortado con enzimas de restricción e hibridado con una sonda de ADN) y Northern Blot (ARN separado e hibridado con sondas de ADN o ARN). Estas técnicas consisten en una separación inicial de las moléculas en base a su peso molecular mediante electroforesis, transferencia capilar de estas moléculas a un filtro de papel o de nylon, fijación, hibridación con la sonda de interés y detección^{62,63}.

Hibridación in situ

Permite la detección de genes o expresión de genes dentro del contexto morfológico de la célula o tejido. Para conseguirlo se requiere que el ácido nucleico sea liberado de su entorno celular para tener acceso la sonda, pero preservando la morfología para la consiguiente interpretación y análisis. Para ello se emplean fijadores especialmente de entrecruzamiento, como la formalina, paraformaldehído, glutaraldehído. El empleo de proteasas, que facilitan el acceso de la sonda al ácido nucleico diana debe ser realizado cuidadosamente para no provocar el desmantelamiento de la morfología celular. Se recomienda el empleo de oligosondas^{62,63}.

Sondas de PNA (Peptide Nucleic Acid)

Fueron inventadas en 1990 por un grupo de científicos daneses (Buchardt, Berg, Nielsen, Egholm). Son una nueva clase de sondas híbridadas entre ácido nucleico y proteínas, diseñadas para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Su estructura esta formada por una cadena de aminoácidos que forman el esqueleto principal, y a los cuales se les unen las bases nitrogenadas, siguiendo los parámetros conformacionales descritos por Watson y Crick, las bases (A,T,C,G) están colocadas a la misma distancia que en el ADN^{62,63}.

Esta estructura híbrida le confiere una serie de características especiales:

- Son moléculas de simple cadena
- No están cargadas siendo el esqueleto principal flexible.
- Sus hibridaciones son rápidas, específicas y sensibles.
- Presentan una especificidad y sensibilidad mas elevada que los oligomeros ADN/ARN
- Hibrida bajo condiciones donde el DNA no puede.
- Enlaces más fuertes
- Moléculas muy estables y no son degradadas por proteasas ni nucleasas.

Transferencia del ADN a soportes sólidos (técnica de Southern):

Se emplea una sonda o *probe* complementaria de la región hipervariable. Las sondas se clasifican, de acuerdo con la localización y número de sitios que presentan sus secuencias complementarias en el genoma, como:

- De *locus múltiple*: Estas sondas reconocen ("hibridizan") a diferentes regiones del genoma, ubicadas en distintos cromosomas, cuya localización precisa se desconoce, produciendo *ADN-fingerprints* ("huellas digitales genéticas") individuo-específicos sobre una membrana que contiene ADN fragmentado enzimáticamente y separado por electroforesis. Las bandas obtenidas se heredan mendelianamente, por lo cual provienen en forma aproximada en un 50 % de cada uno de los progenitores. Entre ellas, las denominadas 33.6 y 33.15, desarrolladas por Jeffreys⁶⁴ que detectan unos 17 fragmentos variables de ADN por individuo, de entre 3.5 y 20 kilobases, o bien el fago M13, que posee secuencias capaces de generar huellas digitales genéticas (HDG), individuo-específicas⁶⁵.
- Otro ejemplo de este tipo de sondas lo constituyen los oligonucleótidos, en secuencias repetidas 5 veces CAC/GTG que también son generadores de *fingerprints*⁶⁶.
- De *locus único* o *locus específicas*: detectan un solo locus hipervariable con una banda por alelo; dada la naturaleza diploide de los humanos, se obtienen patrones de dos bandas (heterocigotas), o patrones de una banda (homocigotas, con alelos de similar tamaño). Su variabilidad está dada por secuencias que se repiten un cierto número de veces, generándose fragmentos de restricción de diferente tamaño (VNTRs), más grandes cuanto más veces esté repetida dicha secuencia. Son altamente polimórficas, por ejemplo, para la sonda YNH24 se han detectado alrededor de 70 alelos de distinto tamaño en la población mundial. Cabría esperar que esta multiplicidad produjera una muy alta capacidad resolutive, sin embargo, algunos alelos se encuentran mucho más representados que otros en la población, por lo cual la mayor o menor certeza de los estudios efectuados dependerá de los análisis de las frecuencias poblacionales para cada variante alélica o banda, que presente cada sistema en particular, la certeza del análisis puede incrementarse utilizando un conjunto de varios loci hipervariables^{67,68}, lo cual disminuye prácticamente a cero la probabilidad de error.

Sistemas basados en diferencias en las secuencias nucleotídicas:

Métodos clásicos de secuenciación

Los dos protocolos clásicos de secuenciación (método químico y enzimático) comparten etapas comunes.

Marcado: Es necesario marcar las moléculas a secuenciar radiactiva o fluorescentemente

Separación: Cada protocolo genera una serie de cadenas sencillas de ADN marcadas cuyos tamaños se diferencian en una única base. Estas cadenas de distintas longitudes pueden separarse por electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida-urea, donde aparecen como una escalera de bandas cuya longitud varía en un único nucleótido. Para obtener estas cadenas se emplean dos procedimientos⁶⁹⁻⁷¹.

Método químico de Maxam y Gilbert

Originalmente descrito por A. Maxam y W. Gilbert en 1977.

Esta técnica consiste en romper cadenas de ADN de cadena sencilla marcadas radiactivamente con reacciones químicas específicas para cada una de las cuatro bases. Los productos de estas cuatro reacciones se resuelven, por electroforesis, en función de su tamaño en geles de poliacrilamida donde la secuencia puede leerse en base al patrón de bandas radiactivas obtenidas.

Método enzimático de Sanger

Este método de secuenciación de ADN fue diseñado por Sanger, Nicklen y Coulson también en 1977 y se conoce como método de los terminadores de cadena o dideoxi.

Para este método resulta esencial disponer de un ADN de cadena simple (molde) y un iniciador, cebador o "primer" complementario de una región del ADN molde anterior a donde va a iniciarse la secuencia. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima ADN polimerasa I que va a extender la cadena copiando de forma complementaria el molde de ADN.

Como la técnica se basa en la síntesis de ADN, para hacer la reacción de secuenciación se necesita:

Como "molde" se utiliza una de las cadenas del fragmento de ADN que se va a secuenciar.

Como "cebador" para iniciar la síntesis, se necesita un corto oligonucleótido complementario del extremo de la cadena.

- Desoxinucleótidos de las cuatro bases: dAMP, dTMP, dGMP, dCMP.
- Didesoxinucleótidos de una base en cada una de las cuatro reacciones de secuenciación.

Al añadir la ADN-polimerasa, comienza la polimerización en el cebador, pero cesa el incorporarse un didesoxinucleótido, se produce un conjunto de cadenas dobles cuyas longitudes dependen de la situación del didesoxinucleótido incorporado.

En el caso expuesto en el dibujo, esta reacción de secuenciación se hace con un didesoxi de adenina, lo que significa que cuando se incorpore esta adenina no podrá continuarse la

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Prevenir y detectar de manera oportuna el cáncer en sus etapas más tempranas de desarrollo, es una de las tareas de las personas dedicadas al cuidado de la salud, por lo que nuestro trabajo se enfoca principalmente a la posible predisposición de los individuos a padecer el cáncer, tomando como referencia la interacción entre el Complejo Mayor de Histocompatibilidad y el Virus del Papiloma Humano-16, ya que para la población mexicana no se cuenta con información al respecto.

Al encontrar una relación entre estas dos variables tendremos la certeza de asegurar que algunas personas son más susceptibles al desarrollo de cáncer, o en su defecto poseen algunos alelos los que les brinden cierta protección ante la enfermedad, este conocimiento permitirá a los pacientes infectados con Virus del Papiloma Humano-16 conocer que tan riesgoso puede ser para ellos el desarrollo de la enfermedad a largo plazo, así como el posible tratamiento para su pronta recuperación.

Este estudio también nos servirá para tener un mayor conocimiento acerca de la las frecuencias génicas que muestran las personas nacidas en el D.F. y área metropolitana, para así compararlas con otros trabajos realizados a distintas poblaciones de la Republica Mexicana.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

HIPOTESIS.

Al determinar el polimorfismo del CMH clase I y II en pacientes con CaCu positivo a VPH-16 permitirá establecer si estas pacientes presentan algún alelo que les confiera cierta susceptibilidad que las predisponga al desarrollo de este cáncer.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Determinar los polimorfismos del CMH clase I y II en pacientes con CaCu positivo a VPH-16.

Objetivos específicos:

Determinar la frecuencia génica para la región HLA-A, HLA-B, HLA-DQ y HLA-DR, en la población de estudio.

Analizar si existe significancia estadística entre las frecuencias obtenidas en el estudio con relación a la población abierta

Identificar si existe diferencia entre las frecuencia obtenidas con relación a las reportadas para otras poblaciones.

DISEÑO DE LA INVESTIGACION

TIPO DE ESTUDIO

La investigación se realizó de acuerdo con un diseño transversal descriptivo.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Mujeres mestizas mexicanas con diagnóstico de Cáncer Cervico Uterino positivo a VPH-16 que residen en el distrito federal y zona metropolitana y que acuden para su atención al "Hospital de Oncología del Centro Medico Nacional Siglo XXI".

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Mujeres con Cáncer Cervico Uterino positivo a VPH-16 (de reciente diagnóstico, en cualquier etapa clínica), de cualquier edad, que tengan vida sexual activa, que aceptaron la participación voluntaria y que residen en el área metropolitana.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Mujeres con VIH,

VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE: Cáncer cervico uterino positivo a VPH-16.

VARIABLE INDEPENDIENTE: Polimorfismo del Complejo Mayor de histocompatibilidad Clase I y II

MATERIAL Y MÉTODO.

I).-Toma de muestras sanguíneas

Material

- Ligadura
- Torundas de algodón
- Jeringas de plástico estériles (5mL) o tubos Vacutainer
- Aguja (calibre entre el 18 al 22)
- Tubos cónicos de 50 mL.}

Reactivos

- Etanol al 70%
- EDTA al 10%

Procedimiento.

- 1) Se preparó el tubo en el que se colocó la muestra sanguínea, colocando la cantidad de anticoagulante adecuada, para el EDTA se utilizó una concentración al 10% en una proporción de 0.1 mL por 5 ml de sangre.
- 2) Una vez obtenida la cantidad necesaria de sangre (3 a 5 mL) se retiró la jeringa de la punción.
- 3) Se vació la sangre por la pared del tubo
- 4) Se mezcló perfectamente la sangre con el anticoagulante hasta su total homogeneización.

NOTA: Riesgo de infección:

Las muestras de sangre deben manejarse con cuidado para evitar la contaminación del operador y del área de trabajo, el operador que trabaja con material de alto riesgo debe usar guantes protectores y si es posible llevar a cabo sus procedimientos en un gabinete de seguridad.

II).- Extracción del material genético (ADN) de las muestras sanguíneas (técnica de *BDtracTM GENOMIC DNA ISOLATION KIT*)

Material

- 100 muestras sanguíneas
- Tubos para microcentrifuga
- Pipetas estériles desechables
- Pipetas semiautomáticas de 1000µL, 200µL 5-50µL
- Puntas estériles de 1000µL, 200µL 5-50µL

Equipo

- ♦ Centrifuga
- ♦ Microcentrifuga Dupont
- ♦ Modulo de calentamiento Temp.-block equatherm con termostato ajustable.

Reactivos

- ♦ Solución BD-1
- ♦ Solución BD-2
- ♦ Solución BD-3
- ♦ Solución BD-4

Procedimiento

1. Se colectaron 2.5 mL de sangre total en un tubo que contenga EDTA en concentración 1mg/L de sangre, transferir los 2.5 mL de sangre a un tubo de polipropileno de 15 mL.
2. Se adicionaron 2.5 mL de la solución BD-1 e invierta varias veces el tubo para que se mezcle perfectamente.
3. Se centrifuga por 10 minutos a 2,200xg usando una centrifuga.
4. Decante el sobrenadante y salve el pellet
5. Adicione 2.5 mL de la solución BD-2 para lavar el pellet, centrifuge por 10 minutos a 2,200xg .
6. Decante el sobrenadante y resuspenda el pellet con 0.6 mL de la solución BD-3 mezcle y con una pipeta transfiera el contenido a un tubo de 1.5 mL e incube a 65^o C por 15 minutos.
7. Adicione 0.2 mL de la solución BD-4 agite el tubo para mezclar perfectamente.
8. Centrifuge por 10 minutos al máximo usando una micro centrifuga, transfiera el sobrenadante a otro tubo con mucho cuidado.
9. Adicionar al sobrenadante 0.6 mL de isopropanol a temperatura ambiente.
10. Mezcle por inversión en tubo de 40 a 50 veces para que el ADN precipite.
11. Centrifuge por 10 minutos al máximo usando una micro centrifuga.
12. Decante el sobrenadante y resuspenda el ADN con 1 mL de etanol al 70% frío.
13. Centrifuge por 5 minutos al máximo usando una micro centrifuga
14. Seque el pellet y adicione 0.5 mL de agua estéril o buffer Te para disolver el ADN.
15. Incube el tubo a 65^o C de 15 a 30 minutos e invierta varias veces durante la incubación
16. Esta listo para su uso.

III).- Cuantificación del material genético (ADN en gel de agarosa).

Material:

- ♦ ADN extraído de las 100 muestras sanguíneas.
- ♦ Probeta de 100 mL.
- ♦ Matraz Erlenmeyer de un volumen tal que pueda contener al menos dos veces la cantidad de buffer añadido.

- Espátula.
- Peines para 14 y 24 posos.
- Molde para gel horizontal de 12 por 14 cm.
- Rollo de masking tape.
- Barra de agitación magnética.
- Pipeta semiautomática de 1-20 μ L.
- Puntas desechables estériles de 20 μ L.
- Puntas para cargar geles desechables estériles.
- Guantes de látex desechables.
- Placas de microtitulación en fondo U.

Equipo:

- Balanza semianalitica Sartorius.
- Parrilla de calentamiento con agitación Corning.
- Cámara para electroforesis con cubierta modelo 14x11 GIBCO BRL.
- Regulador de poder para cámara de electroforesis de 330 volts GIBCO BRL.
- Mezclador con plataforma orbital de 40 a 400 rpm
- Eagle eye still video system que se integra de cámara de vídeo, lentes zoom, thermal printer, filtro de interferencia, monitor de vídeo y almacenadora de imagen (Stratagene).

Reactivos

- Agua destilada y desionizada.
- Agarosa grado electroforetico.
- Amortiguador TAE IX. (Tris base 1M, EDTA 0.5M pH 8 , ácido acético glacial y agua)
- Amortiguador de carga Buffer (azul de bromofenol 0.1g Tris-HCL 1M pH 8, EDTA 0. 5M. glicerol y agua)
- Bromuro de Etidio 1000 X (0. 5mg/mL).
- Controles de ADN de concentración conocida (1, 2.5, 5, 10, 15, 20 y 30 μ g/ μ L).

Procedimiento:

a) Preparación del gel de agarosa:

1.-Preparar los geles de agarosa de acuerdo a la tabla siguiente.

Gel de cuantificación.	
Cantidad de agarosa.	0.8 g.
Cantidad de buffer.	100 mL.
% de agarosa.	0.8 %

2.-Se preparo el molde y se nivelo con una burbuja para gel horizontal cubriendo los extremos con cinta masking tape, para tener un molde con las características deseadas.

3.-Se midieron 100mL de amortiguador TAE IX en una probeta, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500mL para evitar que se derramará durante su calentamiento.

4.-Se pesaron 0.8g de agarosa grado electroforetico, se adicionó al matraz, y se agitó suavemente se marco sobre el matras el volumen total formado, para restituirlo con agua el que se evapore. Calentándose en un horno de microondas ó en una parrilla de calentamiento hasta que toda la agarosa se disuelva. Asegúrese de que todos los cristales se hayan disuelto antes de proseguir.

5.-Después de calentar, se adicionó agua destilada para remplazar el volumen perdido durante el calentamiento.

6.-Se colocó la mezcla en el centro del molde para gel. Se permitió a la agarosa enfriar ligeramente (-60°C) antes de verterla. Se removieron todas las burbujas con una punta o una pipeta desechable del gel sobre el molde. Se colocaron los peines en su posición y se permitió que el gel solidificara por 30 ó 60 minutos.

b) Cuantificación de material genético (ADN).

1.-Se agitaron con vortex las muestras de ADN que se van a cuantificar por 1 5 segundos. se centrifugó brevemente para eliminar las impurezas contenidas en el tubo. Se incubo durante 5 minutos a 65°C .

2.-Se centrifugó brevemente para llevar las impurezas al fondo del tubo.

3.-Se retiró la cinta masking tape y los peines del molde. Se colocó el molde dentro de la cámara de electroforesis de manera que los posos del gel se encuentren del lado del electrodo negativo.

4.-Se adicionó a la cámara amortiguador TAE IX en cantidad suficiente para cubrir el gel en su totalidad.

5.-Se adicionaron 3 μL de amortiguador de carga a cada pozo de la placa de microtitulación. Usando un poso por muestra.

6.-Se adicionarán 7 μL de los estándares de concentración conocida de ADN en cada pozo del gel. Utilice un pozo por muestra.

7.-Por otro lado se adicionaron 7 μL de las muestras de ADN a cada uno de los pozos de la placa de microtitulación que contenían el amortiguador de carga, se mezcló bien, y se colocarán los 10 μL del volumen total de cada muestra en cada pozo del gel.

8.-Una vez que todas las muestras se colocaron en el gel se realizo la electroforesis a 50 volts durante una hora, o bien hasta que el primer colorante se desplace únicamente 1.5 cm del punto de aplicación.

9.-Se retiró el gel de la cámara de electroforesis, se colocó en un recipiente plástico, adicionándole agua suficiente para cubrir el gel y entonces se agregarán 5 μL de Bromuro de Etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

10.-Se colocó el recipiente en el agitador orbital y se agitó a 50 rpm. durante 5 minutos.

11.-Se realizaron por lo menos tres lavados del gel con agua de la llave por 5 minutos, tirando el agua de cada lavado.

12.-Se fotografió el gel bajo luz U.V.

13.-Se determino la cantidad de ADN presente en las muestras comparando la banda obtenida con las bandas generadas por cada uno de los estándares.

Precaución: El Bromuro de Etidio es mutágeno e irritante. Use guantes, evite el contacto a la piel.

NOTA: Debido a que para que se lleve a cabo la amplificación del ADN por medio de la técnica de PCR se requiere una concentración que va de 2ng a 25ng se eligieron todas las muestras cuya concentración estuviera dentro de este rango siendo necesario en algunas ocasiones realizar diluciones de muestras para obtener dicha concentración.

IV) Cuantificación del ADN purificado por espectrofotometría:

Material:

- ♦ ADN extraído de las 100 muestras sanguíneas.
- ♦ Probeta de 100 mL.
- ♦ Tubos de ensayo
- ♦ Guantes de látex desechables.

Equipo:

- ♦ Cuba de carga de cuarzo
- ♦ Espectrofotómetro Gilforg 250
- ♦ Balanza semianalítica Sartorius.

Reactivos

- ♦ Agua destilada y desionizada.

Absorción de luz ultravioleta:

Se efectuó a partir de diluciones 1/200 a 1/500 en agua destilada, para determinar la absorción de luz UV a las longitudes de onda 230, 260, 280 y 320 nm en un espectrofotómetro Gilforg 250.

Las relaciones 260/280 permitieron detectar la presencia de posibles contaminantes en las muestras.

Se calcula el contenido de ADN asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 ug/mL de ADN doble cadena.

V).-Preparación de la mezcla de reacción (según el protocolo DYNAL BIOTECH)

Material

- ♦ Tubos para micro centrifuga de 0.5 mL con tapa plana
- ♦ Pipetas semiautomática de 200 µL y 1-20µL
- ♦ Puntas estériles desechables de 200 µL y 20µL

Reactivos

- ♦ HLA –DR Master Mix.
- ♦ HLA –DQ Master Mix.

- HLA -A Master Mix.
- HLA -B Master Mix.
- Solución de $MgCl_2$ 6.0 mM
- H_2O estéril.

Procedimiento

La mezcla de reacción se prepara como sigue para cada muestra a amplificar:

Mezcla de reacción	Volumen (μL)
Maxter Mix	20 μL
$MgCl_2$	10 μL
H_2O	10 μL

Maxter Mix, contienen Tris-HCl glicero 10%, KCl 100mM dNTP 0.001%, Priemr biotinados, Taq polimerasa 0.01% y acida de sodio 0.05%

VD)-Amplificación de las muestras

Material

- 100 muestras de sangre
- Tubos para micro centrifuga de 0.5 mL con tapa plana
- Pipetas semiautomática de 1-20 μL
- Puntas estériles desechables de 20 μL

Equipo

- Microcentrifuga Dupont
- Perkin -Elmer Gene Amp PCR System 9700

Procedimiento

1. Se añadieron de 200 a 400 ng/ μL de ADN al tubo que contiene la mezcla de reacción preparada en el paso anterior.
2. Se centrifuga la muestra y se coloco dentro del termociclador
3. Se programo el termociclador bajo las siguientes condiciones.

HOLD	35 CICLOS			HOLD
95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
5 minutos	15 segundos	45 segundos	15 segundos	5 minutos

4. Una vez terminados los ciclos se retiraron las muestras y se procedió a realizar la electroforesis en gel. Para determinar los alelos correspondientes.

VII).-Electroforesis de los productos amplificados

Material.

- Los productos de PCR de cada una de las 100 muestras biológicas amplificadas.
- Pipetas semiautomáticas de 1-20 μ L.
- Puntas estériles desechables de 20 μ L.
- Placa de microtitulación con fondo U.

Equipo:

- Cámara para electroforesis horizontal con cubierta **GIBCO BRL**. modelo 14X11.
- Regulador de poder para cámara de electroforesis de 300 volts **GIBCO BRL**.

Reactivos:

- Azul de bromofenol
- Agarosa para productos
- Marcador de peso molecular de 100 pb **GIBCO BRL**.
- Buffer 0.5X TBE (5.4 g Tris base, 2.5 g ácido bórico, 2.0 g EDTA, 1000 mL agua destilada).

Procedimiento:

a) Preparación del gel de agarosa:

1.-Preparar los geles de agarosa de acuerdo a la tabla siguiente.

Gel de cuantificación de Productos.	
Cantidad de agarosa.	2.0 g.
Cantidad de buffer.	100 mL.
% de agarosa.	2.0 %

2.-Se preparo el molde y se nivelo con una burbuja para gel horizontal cubriendo los extremos con cinta masking tape, para tener un molde con las características deseadas.

3.-Se midieron 100 mL de amortiguador Buffer 0.5X TBE en una probeta, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL para evitar que se derramará durante su calentamiento.

4.-Se pesaron 2.0g de agarosa grado electroforetico para productos, se adicionó al matraz, y se agitó suavemente se marco sobre el matras el volumen total formado, para restituirlo con agua el que se evapora. Calentándose en un horno de microondas ó en una parrilla de calentamiento hasta que toda la agarosa se disuelva. Asegúrese de que todos los cristales se hayan disuelto antes de proseguir.

5.-Después de calentar, se adicionó agua destilada para remplazar el volumen perdido durante el calentamiento.

6.-Se colocó la mezcla en el centro del molde para gel. Se permitió a la agarosa enfriar ligeramente (-60°C) antes de verterla. Se removieron todas las burbujas con una punta o una pipeta desechable del gel sobre el molde. Se colocaron los peines en su posición y se permitió que al gel solidificara por 30 ó 60 minutos.

b) Cuantificación del material genético de los productos amplificados (ADN).

- 1.-Se agitaron con vortex las muestras de ADN que se van a cuantificar por 1 5 segundos. se centrifugó brevemente para eliminar las impurezas contenidas en el tubo. Se incubo durante 5 minutos a 65° C.
 - 2.-Se centrifugó brevemente para llevar las impurezas al fondo del tubo.
 - 3.-Se retiró la cinta masking tape y los peines del molde. Se colocó el molde dentro de la cámara de electroforesis de manera que los posos del gel se encuentren del lado del electrodo negativo.
 - 4.-Se adicionó a la cámara amortiguador Buffer 0.5X TBE en cantidad suficiente para cubrir el gel en su totalidad.
 - 5.-Se adicionaron 3 µL de a Azul de bromofenol de carga a cada pozo de la placa de microtitulación. Usando un pozo por muestra.
 - 6.-Se adicionarán 7 µL de los estándares de concentración conocida de ADN en cada pozo del gel. Utilice un pozo por muestra.
 - 7.-Por otro lado se adicionaron 7 µL de las muestras de ADN a cada uno de los pozos de la placa de microtitulación que contienen el amortiguador de carga, se mezcló bien, y se colocarán los 10µL del volumen total de cada muestra en cada pozo del gel.
 - 8.-Una vez que todas las muestras se colocaron en el gel se realizo la electroforesis a 50 volts durante una hora, o bien hasta que el primer colorante se desplace únicamente 1.5 cm del punto de aplicación..
 - 9.-Se retiró el gel de la cámara de electroforesis, se colocó en un recipiente plástico, adicionándole agua suficiente para cubrir el gel y entonces se agregarán 5 µL de Bromuro de Etidio 0.5µg/mL.
 - 10.-Se colocó el recipiente en el agitador orbital y se agitó a 50 rpm. durante 5 minutos.
 - 11.-Se realizaron por lo menos tres lavados del gel con agua de la llave por 5 minutos, tirando el agua de cada lavado.
 - 12.-Se fotografió el gel bajo luz U.V.
 - 13.-Se determino el corrimiento de las bandas, las cuales nos muestran la calidad de los productos amplificados.
- Precaución: El Bromuro de Etidio es mutágeno e irritante. Use guantes, evite el contacto a la piel.

VIII) Determinación de los alelos del CMH mediante una hibridación-SSO.

Material:

- ♦ Probeta de 100 mL.
- ♦ Matraz Erlenmeyer de un volumen tal que pueda contener al menos dos veces la cantidad de buffer añadido.
- ♦ Espátula.
- ♦ Frascos de plástico con tapa
- ♦ Papel higiénico.
- ♦ Pipeta semiautomática de 1-20µL.
- ♦ Puntas desechabas estériles de 20 µL.
- ♦ Placas de microtitulación en fondo U.

Equipo:

- Hibridizador con Agitador.
- Bandeja de hibridación con tapa ambar.
- Mezclador con plataforma orbital de 40 a 400 rpm
- Cámara polaroid con rollo b/n.

Reactivos

- Agua destilada y desionizada.
- SSPE Concentrado .
- SDS Concentrado.
- Citrato Concentrado.
- Tiras de Hibridación según sea el caso (HLA-A, HLA-B, HLA-DQ Y HLA-DR).
- Streptavidin-HRP Conjugado .
- Substrato A.
- Substrato B.

Preparación de los reactivos

Caliente el SSPE Concentrado(2) y el SDS Concentrado (3) en un hibridizador a 50 °C. todos los sólidos deben estar en solución.

a. Preparar el Buffer de hibridación .

Mezcle juntos en el orden siguiente: 55 mL de SSPE Concentrado (2), 213 mL de agua destilada o desionizada y 6.9 mL de SDS Concentrado (3). Mezclar muy bien. Para ayudar a la disolución, la solución puede calentarse a 50^o C. Verter en un deposito de volumen ajustable para posteriormente distribuir 5 mL. Etiquetar y guardar a la temperatura del cuarto. Al preparar el Buffer de hibridación puede guardarse a la temperatura del cuarto, durante 3 meses.

b. Preparar el Buffer de Lavado.

Mezcle juntos en el orden siguiente: 65 mL de SSPE concentrado (2), 1228.5 mL de agua destilada o desionizada y 6.5 mL de SDS Concentrado (3). Se mezcla bien. Vacíe el Buffer de Lavado en 2 envases de volumen ajustables separados que sirvan para distribuir 5 mL. Etiquetar y guardar a la temperatura del cuarto. Puede guardarse el Buffer del Lavado durante 3 meses.

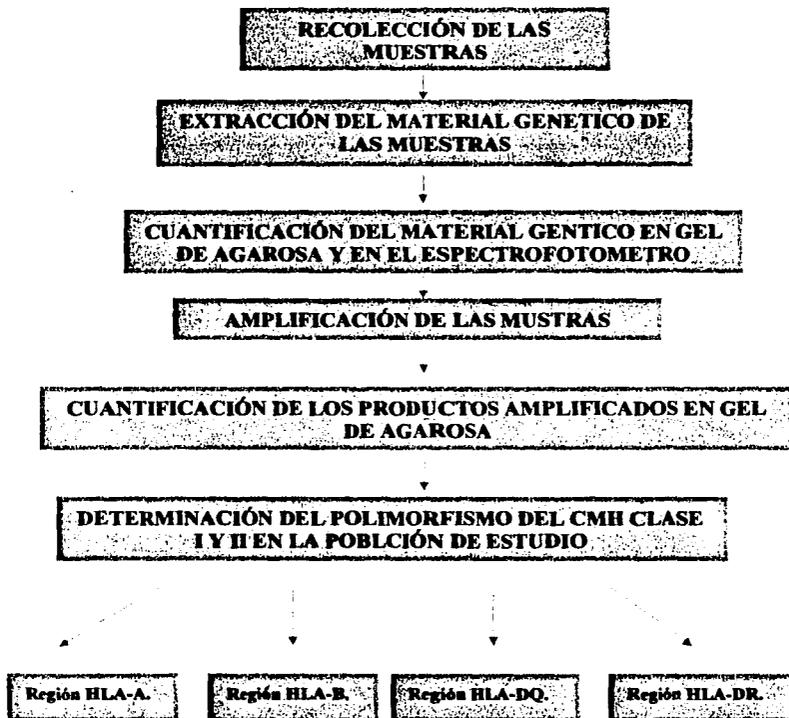
c. Preparar Buffer de Citratos. Diluir 30 mL de Citrato Concentrado (6) con 570 mL de agua destilada o desionizada. Mezcle bien. Verter en un deposito de volumen ajustable para posteriormente distribuir 5 mL. Etiquetar y guardar a la temperatura ambiente. El Buffer de Citratos preparado se puede guardar por 3 meses.

Procedimiento:

- a. Calentar el Buffer de Hibridación y el Buffer de Lavado en el hibridizador a 50° C.
- b. Mantener los otros reactivos a temperatura ambiente.
- c. Calentar el hibridizador a 50° C y ajustar el nivel del agua a 1/2 a 1 cm sobre la plataforma del agitador. Verifique la posición de la bandeja para que el agua no salpique en los pozos de la bandeja a una velocidad de 60 rpm.
- d. Usar una tira nueva, marcar con un lápiz al final de la tira de la línea de tinta. Use una tira separada para cada pozo en la bandeja.
- e. Agregar 5 mL del Buffer de Hibridación previamente calentado a cada pozo.
- f. Usando una pipeta de 200 µL, agregue 70 µL de muestra amplificada desnaturalizada en el pozo adecuado de la bandeja, dejar que se mezcle bien en el hibridizador. Repita este procedimiento para el cada prueba amplificada usando una punta nueva para cada muestra.
- g. Colocar la tapa de la bandeja en su lugar dentro del hibridizador a 50° C, Incube durante 30 minutos a una velocidad de agitación de 60 rpm.
- h. Retirar la bandeja del hibridizador, aspirar los volúmenes con una pipeta formando un ángulo para vaciar los pozos por completo. Limpie la tapa de la bandeja con una toalla de papel.
- i. Distribuir 5 mL del Buffer de lavado a cada pozo. Incline la bandeja de un lado a otro durante algunos segundos y aspire fuera de la bandeja la solución.
- j. Distribuya 5 mL de Buffer de lavado precalentado en cada pozo y regresar la bandeja al hibridizador a 50° C, incubar durante 15 minutos a una velocidad de 60 rpm. El tiempo y temperatura de este paso son críticos en el desarrollo de esta técnica.
- k. Preparar solución de trabajo conjugado agregando 5.3 mL de Buffer de lavado y 16 µL de Streptavidin-HRP Conjugado (4) para cada pozo y tira. Mezcle suavemente en el agitador. No prepare más si no se va a utilizar antes de 15 minutos.
- l. Quite la bandeja del hibridizador y aspire bien el volumen de cada uno de los pozos. Agregue 5 mL de solución de trabajo conjugado a cada pozo. Ponga la bandeja en un agitador a la temperatura ambiente durante 15 minutos a una velocidad de 60 rpm.
- m. Quite la bandeja del agitador, enjuague la tapa ámbar con agua y limpie con una toalla del papel. Aspire los volúmenes de cada pozo. Distribuya 5 mL de buffer de Lavado de Ambiente en cada pozo. Incube a temperatura ambiente por 5 minutos agitar a una velocidad de 60 rpm.
- n. Repita el paso (m.) una vez más.
- o. Retire la bandeja del agitador y decante la solución lavadora. Agregue 5 mL del Buffer de Citratos a cada pozo. Ponga la bandeja en el agitador orbital a la temperatura ambiente durante 5 minutos a una velocidad de 60 rpm.
- p. Prepare el reactivo de revelado mezclando 4.4 mL del Substrato A y 1.1 mL Substrato B para cada. Mezcle suavemente. Prepare este reactivo durante los tiempos muertos de la técnica y protéjalo de la exposición a la luz.

- q. Quite bandeja del agitador y aspire los volúmenes de cada pozo. Agregue 5 mL de Substrato de trabajo a cada pozo. Coloque la tapa ámbar en la bandeja para proteger de la luz. Ponga la bandeja en el agitador orbital a temperatura ambiente por 10 minutos a una velocidad de 60 rpm.
- r. Quite la bandeja del agitador orbital y aspire cada pozo. Agregue 5 mL de agua destilada o desionizada en cada pozo. Ponga la bandeja en el agitador orbital a temperatura ambiente durante 5 minutos a una velocidad de 60 rpm.
- s. Repetir el Paso (r.) dos veces.
- t. Interpretación de las tiras de acuerdo a la tabla de cada manual. Redactar de acuerdo al manual de amplicor.

DIAGRAMA DE FLUJO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISEÑO ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Chi cuadrada (X^2).

La comparación entre dos grupos de estudio en función de dos características independientes, se efectúan generalmente tablas de contingencia de 2×2 .

Para establecer la probabilidad de que ambos grupos difieran unos de otros en forma significativa, y que su variación no haya sido al azar, la tabla de 2×2 se evalúa mediante la prueba X^2 .

$$X^2 = \frac{(ad - bc)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Si el valor obtenido de la prueba de X^2 implica de un valor de " p " menor de 0.05

El valor de " p " se obtiene al interpretar tablas de distribución X^2 . El valor numérico de X^2 en función de los grados de libertad de la prueba deja de tener validez y se debe utilizar en este caso la prueba exacta de Fisher que nos da directamente el valor de " p ".

RESULTADOS

Se le determinaron los polimorfismo del CMH a 94 muestras sanguíneas de pacientes con Cáncer Cervico Uterino positivo a VPH-16, por lo que se obtuvieron un número doble de alelos como resultados, Arrojando los siguientes datos :

Alelos más sobresalientes de HLA-A, HLA-B, HLA-DQB1 Y HLA-DRB1 en pacientes con Cáncer Cervico Uterino Positivo a VPH-16

Tabla 1

ALELO HLA-A	No OBSERVADO	FRECUENCIA GENOTÍPICA RELATIVA
01	13	0.0691
02	60	0.3191
03	4	0.0212
04	1	0.0053
11	4	0.0212
23	3	0.0159
24	30	0.1595
26	10	0.0531
29	4	0.0212
30	9	0.0478
31	9	0.0478
32	9	0.0478
33	3	0.0159
36	1	0.0053
68	28	0.1489
TOTAL	188	1

Tabla 2

ALELO HLA-B	No OBSERVADO	FRECUENCIA GENOTÍPICA RELATIVA
07	11	0.0585
08	6	0.0319
13	1	0.0053
14	13	0.0691
15	12	0.0638
18	14	0.0744
35	43	0.2287
38	1	0.0053
39	22	0.1170
40	16	0.0851
41	2	0.0106
44	10	0.0531
47	2	0.0106
48	6	0.0319
49	6	0.0319
50	2	0.0106
51	7	0.0372
52	3	0.0159
53	4	0.0212
55	2	0.0106
56	2	0.0106
78	3	0.0159
TOTAL	188	1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3 Tabla 4

ALELO HLA-DQB1	No OBSERVADO	FRECUENCIA GENOTÍPICA RELATIVA
201	25	0.1329
301	36	0.1914
302	46	0.2446
304	1	0.0053
402	43	0.2287
501	20	0.1063
503	1	0.0053
601	2	0.0106
602	11	0.0585
603	2	0.0106
604	1	0.0053
TOTAL	188	1

ALELO HLA-DRB1	No OBSERVADO	FRECUENCIA GENOTÍPICA RELATIVA
01	15	0.0797
03	17	0.0904
04	49	0.2606
07	9	0.0478
08	40	0.2127
10	5	0.0265
11	4	0.0212
12	2	0.0106
13	17	0.0904
14	10	0.0531
15	10	0.0531
16	10	0.0531
TOTAL	188	1

NOTA: Se reportaron sólo los datos de los cuales se obtuvo un valor.

Tablas de comparación de las frecuencias de HLA-A, HLA-B, HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con Cáncer Cervico Uterino positivo a VPH-16 y sujetos sanos como control

Se utilizaron 99 pacientes sanos como la población control:

N = número de pacientes n = número de alelos fg = frecuencia génica.

Tabla 5

Alelo	Pacientes		Controles	
	(N=94)		(N=99)	
	n	fg	n	fg
A01	13	0.0691	15	0.075
A02	60	0.3194	56	0.282
A03	4	0.0212	12	0.066
A11	4	0.0212	9	0.045
A24	30	0.1595	29	0.146
A26	10	0.0531	9	0.045
A29	4	0.0212	9	0.045
A31	7	0.0372	14	0.070
A68	28	0.1489	22	0.121

Tabla 6

Alelo	Pacientes		Controles	
	(N=94)		(N=99)	
	n	fg	n	fg
B07	11	0.0585	12	0.060
B08	6	0.0319	7	0.035
B14	13	0.0691	14	0.070
B15	12	0.0638	12	0.060
B35	43	0.2287	26	0.131
B39	22	0.1170	27	0.136
B40	16	0.0851	20	0.101
B41	2	0.0106	2	0.010
B44	10	0.0531	16	0.080
B50	2	0.0106	2	0.010
B51	7	0.0372	14	0.070
B52	3	0.0159	4	0.020
B53	4	0.0212	2	0.010

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 7

Alelo	Pacientes		Controles	
	(N=94)		(N=99)	
	n	fg	n	fg
DQ201	25	0.1329	22	0.1111
DQ301	36	0.1914	35	0.1767
DQ302	46	0.2446	47	0.2373
DQ402	43	0.2287	33	0.1666
DQ501	20	0.1063	12	0.0606
DQ602	11	0.0585	15	0.0757
DQ604	1	0.0053	3	0.0151

Tabla 8

Alelo	Pacientes		Controles	
	(N=94)		(N=99)	
	n	fg	n	fg
DR01	15	0.0797	10	0.050
DR03	17	0.0904	11	0.055
DR04	49	0.2606	47	0.237
DR07	9	0.0478	22	0.111
DR08	40	0.2127	33	0.166
DR11	4	0.0212	20	0.101
DR13	17	0.0904	10	0.050
DR14	10	0.0531	21	0.106

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Alelos con significancia asociativa en pacientes con Cáncer Cervico Uterino positivo a VPH-16 en comparación a sujetos control

Los cálculos estadísticos se realizaron con el subprograma "statcalc" perteneciente al programa EPI INFO 200

N = número de pacientes n = número de alelos fg = frecuencia génica.

Tabla 9

Alelo	Pacientes (N =94)		Controles (N =99)		X ²	P	PC	RR
	n	fg	n	fg				
*B35	43	0.2287	26	0.131	6.23	0.0125	0.0180	1.36
*DR07	9	0.0478	22	0.111	5.22	0.0223	0.0359	0.58
*DR11	4	0.0106	20	0.101	10.51	0.0011	0.0024	0.33
*DR14	10	0.0531	21	0.106	3.65	0.0560	0.0848	0.64
DQ201	25	0.1329	22	0.1111	0.43	0.5113	0.6163	1.11
DQ301	36	0.1914	35	0.1767	0.14	0.7090	0.8090	1.05
DQ402	43	0.2287	33	0.166	2.35	0.1253	0.1601	1.21
DQ501	20	0.1063	12	0.0606	2.66	0.1030	0.1482	1.32
DQ602	11	0.0585	15	0.0757	0.46	0.4992	0.6365	0.86

Los datos que presentan el * son los únicos que mostraron una significancia estadística, los restantes se reportaron por tener una estrecha relación con la bibliografía .

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 10 Relación entre las frecuencias génicas encontradas y las reportadas para poblaciones de origen Mestizo mexicano (HLA-A y HLA-B) y Mazatecos mexicanos (HLA-DQB1 Y HLA-DRB1).

ALELO	HLA-A		ALELO	HLA-B		ALELO	HLA-DQB1		ALELO	HLA-DRB1	
	E n=94	R n=55		E n= 94	R n= 87		E n= 94	R n= 89		E n= 94	R n= 89
01	0 0691	0 0770	07	0 0585	0 0600	201	0 1329	nr	01	0 0797	0 0070
02	0 3191	0 2820	08	0 0319	0 0360	301	0 1914	0 3160	03	0 0904	nr
03	0 0212	0 0600	13	0 0053	0 0190	302	0 2446	0 4850	04	0 2606	0 4840
04	0 0053	nr	14	0 0691	0 0700	304	0 0053	nr	07	0 0478	0 0070
11	0 0212	0 0430	15	0 0638	nr	402	0 2287	0 1330	08	0 2127	0 01330
23	0 0159	0 0150	18	0 0744	0 034	501	0 1063	0 0140	10	0 0265	0 0070
24	0 1595	0 1450	35	0 2287	0 1330	503	0 0053	nr	11	0 0212	0 0070
26	0 0531	0 0440	38	0 0053	0 0130	601	0 0106	0 0350	12	0 0106	nr
29	0 0212	0 0460	39	0 1170	0 1380	602	0 0585	0 0070	13	0 0904	nr
30	0 0478	0 0320	40	0 0851	nr	603	0 0106	nr	14	0 0531	0 1190
31	0 0478	0 0710	41	0 0106	0 0120	604	0 0053	nr	15	0 0531	0 0490
32	0 0478	0 0250	44	0 0531	0 0810				16	0 0531	0 1830
33	0 0159	0 0250	47	0 0106	nr						
36	0 0053	nr	48	0 0319	nr						
68	0 1489	nr	49	0 0319	0 0350						
			50	0 0106	0 0100						
			51	0 0372	0 0710						
			52	0 0159	0 0220						
			53	0 0212	0 0120						
			55	0 0106	0 0070						
			56	0 0106	nr						
			78	0 0159	nr						

E= para frecuencias génicas encontradas, R= para frecuencias génicas reportadas, nr = para datos no reportados.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El estudio inicio con 100 muestras de las pacientes con CaCu positivo a VPH-16, de las cuales sólo 94 muestras se incluyeron en el estudio, las 6 muestra restantes se eliminaron por que las pacientes no cumplieron con los criterios de inclusión solicitados

Las frecuencias génicas de HLA-A (tabla 1), HLA-B (tabla 2), HLA-DQB1 (tabla 3) y HLA-DRB1 (tabla 4), fueron los primeros resultados que se obtuvieron para su posterior comparación con las personas sanas que fueron nuestro grupo control; el cual estaba compuesto por 99 individuos sanos nacidos en México, al igual que sus dos últimas generaciones, cuyo origen y residencia son el D.F. y zona metropolitana, sin antecedentes de enfermedad autoinmune, ni cáncer.

La comparación entre estas dos poblaciones se encuentra en las **tabla 5** para HLA-A, **tabla 6** HLA-B, **tabla 7** HLA-DQB1 y **tabla 8** HLA-DRB1, con estos datos se logro iniciar el análisis estadístico de donde se obtuvo la **tabla 9**, con los alelos más representativos, ya que sólo estos mostraron significancia estadística.

En el sistema HLA-A nuestros resultados no arrojaron significancia estadística, hasta la terminación de este trabajo aun no se ha reportado relación alguna entre el CaCu positivo a VPH-16 y los alelos HLA-A.

En el sistema HLA-B, para nuestros pacientes estudiados, se encontró un elevado riesgo a desarrollar el cáncer (RR=1.36 con P=0.0125 tabla 9), y en nuestros resultados no obtuvimos resultados significativos para otros alelos. En el caso del alelo HLA-B*35 estudios realizados en la ciudad de México reportaron un incremento al riesgo de desarrollar Cáncer Cervico Uterino,

Para los resultados de HLA-DRB1 se reporta que el alelo DRB1*13 disminuye el riesgo de desarrollar cáncer cervico uterino positivo a VPH-16 esto fue obtenido por el instituto nacional de cáncer, Bethesda, Maryland USA⁷⁶, mientras que para este estudio los resultados los alelos DRB1*14 (RR=0.64 con P=0.0560 tabla 9), DRB1*07 (RR=0.58 con P=0.05223 tabla 9) y DRB1*11 (RR=0.33 con P=0.0011 tabla 9), disminuyen el riesgo de desarrollar Cáncer Cervico Uterino en los pacientes estudiados.

En cuanto al sistema HLA-DQB1 se ha reportado que alelos como el DQB1*201, DQB1*301, DQB1*302, DQB1*303, DQB1*402 y DQB1*602, que se asocian con un incremento o disminución del riesgo de desarrollar cáncer cervico uterino positivo a VPH-16^{77,78}, en el caso del alelo DQB1*303, estudios en USA, y el alelo DQB1*402 en España reportan una asociación con un elevado riesgo de desarrollar cáncer cervico uterino positivo a VPH-16^{92,93}. Mientras que los alelos DQB1*201, DQB1*301, DQB1*302, presentan una asociación con una disminución del riesgo de desarrollar cáncer cervico uterino positivo a VPH-16^{78,79}, finalmente se reporta una controversia entre la asociación que existe entre el alelo DQB1*602 y el alelo DRB1*1501, ya que en un estudio realizado en Londres no se reporto ninguna asociación, en un estudio realizado en USA⁷⁶ se reportaron asociados con una disminución en el riesgo de desarrollo de cáncer, mientras que en estudios realizados

en Suecia, Brasil y USA⁸³ estos alelos mostraron una asociación con un elevado riesgo de desarrollar este cáncer,^{76,80-83} pero en nuestro caso el sistema HLA-DQB1, no mostró significancia estadística alguna.

Los datos que se obtuvieron indican que en el sistema HLA-A, los alelos A*02 (E= 31%, R= 28% tabla 10), A*24 (E= 15%, R= 14% tabla 10) presentaban una frecuencia muy parecida a la de la referencia, pero el alelo A*68 (E= 14%, R= 0% tabla 10) mostraba un porcentaje muy elevado en los controles y la referencia no reporta datos⁸⁴, para el sistema HLA-B, los alelos se comportaron de forma muy similar a los de la referencia, sólo el B*35 (E= 22%, R= 13% tabla 10) mostró diferencia entre sus frecuencias⁸⁴, los alelos que mostraron la mayor diferencia entre ellos fueron el DQ*301 (E= 19%, R= 31% tabla 10), DQ*302 (E= 24%, R= 48% tabla 10) y el DQ*402 (E= 22%, R= 13% tabla 10), en cuanto a los demás alelos no hubo diferencia entre ellos⁸⁵, por último el sistema HLA-DRB1, los alelos DR*01 (E= 7%, R= 0.7% tabla 10), DR*04 (E= 26%, R= 48% tabla 10), DR*08 (E= 21%, R= 1% tabla 10), DR*14 (E= 5%, R= 11% tabla 10), y el DR*16 (E= 5%, R= 18% tabla 10), mostraron una diferencia entre ellos; fue en este sistema donde hubo una mayor discrepancia entre los datos obtenidos⁸⁵.

Aunque inicialmente el objetivo del trabajo fue el de determinar el polimorfismo del CMH de clase I y II en pacientes con CaCu positivo a VPH-16 los resultados nos permitieron comparar los datos obtenidos con otras poblaciones nativas de la republica mexicana para así contribuir con una mayor información sobre los polimorfismos del CMH, también se corroboraron los datos similares a los reportados en las referencias por lo que este estudio no sólo contribuye a aumentar los datos estadísticos si no que permite evaluar nuevos datos interesantes para posteriores estudios.

Sin embargo aun es muy arriesgado predecir que tanto ayuda a los pacientes el conocimiento de estos datos, ya que en el caso de la relación entre los alelos DQB1*602 y el DRB1*1501 en el cual existe gran controversia, nos hace reflexionar que el CMH no actúa de forma independiente y que es el resultado de una serie de pasos secuenciales y que probablemente el desarrollo de la enfermedad no sea sólo el resultado de la expresión del polimorfismo del CMH si no que debido a procesos dentro del mismo CMH los cuales son aun más complejos, pero no por eso debemos de dejar de trabajar sobre esta línea de investigación ya que estos datos nos permiten entender con mayor detalle el desarrollo de la enfermedad y la posible susceptibilidad provocada por estos alelos a desarrollar el cáncer y el como aplicar los conocimientos descubiertos para ofrecer una mayor protección a los pacientes que cursan con este tipo de enfermedad.

Finalmente este trabajo es sólo una parte de un proyecto más grande, que además permitirá tener una mejor perspectiva sobre la relación entre el Cáncer Cervico Uterino y el virus de el papiloma humano en todas sus variantes.

CONCLUSIONES

El objetivo inicial que fue determinar los polimorfismos del CMH I y II, se cumplió de manera aceptable, ya que se obtuvieron 94 muestras para todos los sistemas y sus frecuencias (tablas 1-4).

Las frecuencias fueron comparadas con 99 muestras de individuos sanos (tablas 5-8) para obtener nuestro siguiente objetivo, que fue el de determinar la significancia estadística entre el CMH y el CaCu positivo a VPH-16, solo para los valores reportados en la tabla 9, que mostraron que sí existe una relación entre estas dos variables, como protección en algunos casos o elevado riesgo en otros, ya que por el momento no se contaba con información al respecto en el D.F. y zona metropolitana.

Por lo que se sugiere implementar esta técnica como medio de prevención en el desarrollo del Cáncer Cervico Uterino en ayuda a los pacientes susceptibles a padecerlo.

Finalmente también se obtuvieron datos que permitieron un mayor conocimiento acerca de las frecuencias génicas de las personas nacidas en el D.F. y zona metropolitana para su comparación con otras poblaciones de México, estos datos servirán como referencia para posteriores estudios (tabla 10).

REFERENCIAS

1. Dirección General de Epidemiología. Compendio de información epidemiológica de cáncer, 1982-1988. México: SSA, 1991.
2. Vargas M, Palacios E, Kuri P, Méndez R. Magnitud del Cáncer Cérvico Uterino en México. *Gac Méd Méx* 1997;134:365-368
3. Juárez-Vergara P, Meza-Banda S. Cáncer cérvico uterino y citología exfoliativa. Jefatura de Servicios de Medicina Preventiva. México: IMSS, 1986.
4. Martín J, Suárez L. Cancer mortality among Mexican, Americans and other whites in Texas (1969-1980). *Am J Public Health* 1987;77:851-853.
5. Oscar Rojas Espinosa, Inmunología (de Memoria) 1ª Edición, Editorial Médica Panamericana México 1996 pag 151-164.
6. Abul. K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober, Inmunología Celular y Molecular, Segunda Edición, Interamericana McGraw-Hill 1995 España 106-126.
7. Koutsky L Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am. J. Med.* 1997 102: 3-8.
8. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. World Cancer Research Fund in Association With American Institute for Cancer Research, NW Washington DC, 1997.
9. Restrepo HE, González J, Roberts E, Litvak J. Epidemiología y control del cáncer del cuello uterino en América Latina y el Caribe. *Bol Of Sanit Panam* 1987;102:578-592.
10. Muñoz N The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. En: Muñoz N, Bosh F, Shah K (Ed), HPV and cervical cancer, IARC Scientific, Lyon, France, 1992 Publications 110, p. 251-262.
11. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholer S, Stanton CK, Manos MM Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intra-epithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993 85: 958-964.
12. Quinn TC Nuclei acid amplification assay for sexually transmitted diseases. En: Lee H, Morse S. Olsvik (Ed), Nuclei acid amplification technology: Application to disease diagnosis, Eaton Publishing, Natick, USA, 1997 p. 201-232.
13. Ferenczy A. Cervical Intraepithelial Neoplasia. In: Blaustein A. Ed. Pathology of Female Genital Tract. New York: Heidelberg, Berlin. Springer-Verlag 1977:156-177.
14. Canadian Task Force. Cervical Cancer Screening Program: Epidemiology and Natural History of Carcinoma of the Cervix. *Can Med Assoc J* 1976;114:1001-1031.
15. Hall SE, Walton L. Dysplasia of the Cervix. A Prospective Study of 206 Cases. *Am J Obstet Gynecol* 1968;100:662-671.
16. Kiviat N. Natural History of Cervical Neoplasia: Overview and Update. *Am Journal Obstet Gynecol* 1996;175:1099-1104.
17. Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounesll EF, Renouf DV, Rowe M et al. The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med* 1995;5:464-470.

18. Odunsi K, Terry G, Ho L, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Association between HLA DQB1*03 and cervical intra-epithelial neoplasia. *Mol Med* 1995;1:2:161-171.
19. Vandenvelde C, De Foor M, Van Beers D. HLA.DOB1*03 and cervical neoplasia grades I-III (letters). *Lancet* 1993;341:8854:1215.
20. Cavuslu S, Mant C, Starkey WG, Bible JM, Biswas C, Kell B, Rice P, Best JM, Cason J Analytical sensitivities of hybrid-capture, consensus and type-specific polymerase chain reactions for the detection of human papillomavirus type 16 DNA. *J. Med. Virol.* 1996 49: 319-324.
21. Cole HM Diagnostic and therapeutic technology assessment: human papillomavirus DNA testing in the management of cervical neoplasia. *J. Am. Med. Assoc.* 1993 270: 2975-2981.
22. Coutlée F, Provencher D, Gauthier J Is there a clinical utility for HPV detection test for screening preinvasive and invasive diseases of the uterine cervix?. *Germs Ideas* 1997 2: 40-44.
23. de Villiers EM Human pathogenic papilloma-virus types: an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994 186: 1-12.
24. de Villiers EM Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed. Pharmacother.* 1998 52: 26-33.
25. Evander M, Edlund K, Bodun E Comparison of a one-step and two-step polymerase chain reaction with the degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J. Clin. Microbiol.* 1992 30: 987-992.
26. Franco EL Cancer causes revisited: Human papillomavirus and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995 87: 779-780.
27. Ho GYG, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S Persistent genital human papillomavirus as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995 87: 1365-1371.
28. International Agency for Research on Cancer Work-ing Group Human papillomaviruses. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 1995 64: 35-282.
29. Muñoz N The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. En: Muñoz N, Bosh F, Shah K (Ed), *HPV and cervical cancer*, IARC Scientific, Lyon, France, Publications 1992 110, p. 251-262.
30. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholer S, Stanton CK, Manos MM Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical in- trans-epithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993 85: 958-964.
31. Shah KV, Solomon L, Daniel R, Cohn S, Vlahov D Comparison of PCR and hybrid capture methods for detection of human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 1997 35: 517-519.
32. Sun XW, Ferenczy A, Johnson D, Koulos JP, Lungu O, Richart RM, Wright TC Jr. Evaluation of the hybrid capture human papillomavirus deoxyri-bonucleic acid detection test. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995 173: 1432-1437.
33. Ting Y, Manos MM Detection and typing of genital human papillomavirus. En: Innis MA, Gelfant DH, Sneysky JJ, White TJ (Ed), *PCR Protocols*, Academic Press, San Diego, 1990 p. 356-367.

34. van de Brule AJC, Snidjers PJF, Gordjin RLJ, Bleker OP, Meijer CJLM, Walboomers JMM. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int. J. Cancer* 1990 45: 644-649.
35. Van Ranst, Tachezy R, Delius H, Burk RD. Taxonomy of the human papillomavirus. *Papilloma-virus Rep.* 1993 4: 61-65.
36. J.Klein, The HLA System. *The New England journal of Medicine*(2000.343: 702-709.
37. J. Banciereau. Et al. Dendritic Cells and The Control of Immunity. *Nature* 392: 245-253.
38. Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-Restricted cytotoxic T Cells: Studies on the Biological Role of Polymorphic Major Transplantation Antigens Determining T-cells Restriction-Specificity, Function and Responsiveness. *Advances in Immunology* 1979;27: 51-58.
39. López de Castro JA, Barbosa J, Krangel MS, Biron PA, Strominger JL. Structural analysis of functional sites of class I HLA antigens. *Immunol Rev* 1985; 85:149-168.
40. Townsend A. Ohlen C, Batin J, Ljunggren H, Foster L, Karre K. Association of Class I Major Histocompatibility Heavy and Light Chains Induce by Viral Peptides. *Nature* 1989;340: 443-447.
41. Hilders CG, Houbiers JG, Krul EJ, Fleuren GJ. The expression of histocompatibility-related leukocyte antigens in the pathway to cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1994;101:1:5-12.
42. Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounesl EF, Renouf DV, Rowe M et al. The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med* 1995;5:464-470.
43. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Cabello RF, Stern LP. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol Today* 1993;14:491-499.
44. Cromme FV, Airey J, Heemels MT, Ploegh HL, Keating PJ, Meijer CJ et al. Loss of transporters protein encoded by the TAP-1 gene, in highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 1994;179:1:335-340.
45. Wank R, Meulen JT, Luade J, Eberhardt HC, Pawlita M. Cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, and risk for patients with HLA-DQB1*0602.*301, *0303 alleles [comment]. *Lancet* 1992;342:8870:553.
46. Odunsi K, Terry G, Ho L, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Association between HLA DQB1*03 and cervical intra-epithelial neoplasia. *Mol Med* 1995;1:2:161-171.
47. Helland A, Borresen AL, Krinstensen G, Ronningen KS. DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinomas of the cervix: Relationship to human papillomavirus infection and prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:6:479-486.
48. Mehal WZ, LoYM, Herrington CS, Evans MF, Papadopoulos MC, Odunsi K et al. Role of human papillomavirus in determining the HLA associated risk of cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol* 1994;47:12:1077-1081.
49. Mehal WZ, LoYM, Herrington CS, Evans MF, Papadopoulos MC, Odunsi K et al. Role of human papillomavirus in determining the HLA associated risk of cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol* 1994;47:12:1077-1081.

50. Wank R, Thomssen C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQW3. *Nature* 1991;352:723-725.
51. Ferguson, A. et al. Expresión de productos de MHC y antígenos de diferenciación de leucocyte en neoplasmas del gynaecological: un análisis del inmunohistological de las células del tumour y leucocytes infiltrando. *Br. J. Cáncer* . 1985 52, 551-563 [PubMed]
52. Nepom GT. HLA class II variants. Structural studies and disease associations in autoimmunity: experimental and clinical aspects. *Ann NY Acad Sci* 1989; 456: 1-11.
53. Mc Devitt HO. The HLA system and its relation to disease. *Hosp Pract* 1985; 20: 57-72.
54. Saiki, R; Bugawan, T; Horn, G; Mullis, K and Erlich, H *Nature* 1986 324: 163-166.
55. White T.J. Arnheim N. Erlich H. A. The Polymerasa Chain Reaction. *Trends in Genetics*, 1989;6 : 185-188.
56. Saiki R.K. The Design and Optimization of the PCR Technology Principles and Application . E.U.A.: Academic Press Inc. 1989; 7-16.
57. Gelfand D H. Taq Polymerase in PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplifications. Stockton Press- 1990:17-22.
58. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S. and Erlich, H. A.. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termostable DNA polymerase. *Science* 1988 239: 487-491.
59. Boerwinkle, E.; Xiong, W.; Fourest, E. and Chan, L.. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the PCR: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1989 86: 212-216.
60. Sajantila, A.; Ström, M.; Budowle, B.; Karhunen, P. J. and Peltonen, L.. The PCR and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQalpha loci to the identification of fire victims. *For. Sci. Int.* 1991 51: 23-24.
61. Kloosterman, A. D.; Budowle, B. and Daselaar, P.. PCR amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. *Int. J. Leg. Med.* 1993 105: 257-264.
62. Landegren U.,R. Kaiser, C.T.Caskey, L. Hood DNA diagnostic-molecular techniques and automatization. *Science* 1998;242:229-237.
63. Cartwright C.P. Techniques and diagnostic applications of in vivo nucleic acid amplification. *Clin Microbiol News* 1994;16:33-40
64. Jeffreys, A. J.; Wilson, V and Thein, S.. *Nature* 1985 314: 67-73.
65. Vassart, G.; Georges, M.; Monsieur, R.; Brocas, H. and Lequarre, S.. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* 1987 235: 683-684.
66. Nurnberg, P.; Roewer, L.; Neitzel, H.; Sperling, K.; Popperl, A.; Hundrieser, J.; Poche, H.; Epplen, C.; Zischler, H. and Epplen, J. T.. DNA fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)5/(GTG)5: somatic stability and germline mutations. *Hum. Genet.* 1989 84: 75-78.
67. Wong, Z.; Wilson, V.; Patel, I.; Povey, S. and Jeffreys, A. J.. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann. Hum. Genet.* 1987 51: 269-288.
68. Smith, J. C.; Anwar, R.; Riley, J.; Jenner, D.; Markham, A. F. and Jeffreys, A. J.. Highly polymorphic minisatellite sequences: allele frequencies and mutation rates

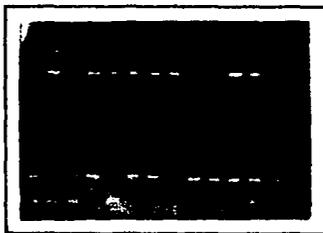
- for five locus specific probes in a caucasian population. *J. For. Sci. Soc.* 1990 30: 19-32.
69. Saiki, R. K.; Walsh, P. S.; Levenson, C. H. and Erlich, H. A.. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989 86: 6230-6234.
 70. *Amplitype User Guide* 1990. Cetus Corp., Emeryville, C.A.
 71. Comey, C.; Budowle, B.; Adams, D.; Baumstark, A.; Lindsey, J. and Presley, L. PCR amplification and typing of the HLA DQalpha gene in forensic samples. *J. For. Sci.* 1993 38: 239-249.
 72. Budowle, B.; Lindsey, J.A.; DeCou, J.A.; Koons, B.W.; Giusti, A.M. and Comey, C.T. Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and Gc (PM loci), and the DQa using a multiplex amplification and typing procedure. *Journal of Forensic Sci.* 1994 (in press).
 73. Edwards, A.; Civitello, A.; Hammond, H. A. and Caskey, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 1991. 49: 746-756.
 74. Kimpton, C.; Walton, A.; Gill, P. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet* 1992. 1: 28.
 75. Wiegand, P.; Budowle, B.; Rand, S.; Brinkmann, B. Forensic validation of the STR system SE33 and TC11. *Int. J. Leg. Med.* 1993 105: 315-320.
 76. Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, Marti D, Kissner T, Sherman ME, Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998 Nov;7(11):1035-41
 77. Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women, *Int J Cancer* 1994 May 15;57(4):504-7
 78. Neuman RJ, Huettner PC, Li L, Mardis ER, Duffy BF, Wilson RK, Rader JS, Association between DQB1 and cervical cancer in patients with human papillomavirus and family controls, *Obstet Gynecol* 2000 Jan;95(1):134-40
 79. Helland A, Borresen AL, Kristensen G, Ronningen KS, DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: relationship to human papillomavirus infection and prognosis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994 Sep;3(6):479-86
 80. Beskow AH, Josefsson AM, Gyllensten UB, HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ, *Int J Cancer* 2001 Sep15;93(6):817-22
 81. Cuzick J, Terry G, Ho L, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P, Duncan I, Association between high-risk HPV types, HLA DRB1* and DQB1* alleles and cervical cancer in British women, *Br J Cancer* 2000 Apr;82(7):1348-52
 82. Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML, Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Nov;9(11):1183-91
 83. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM, HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity, *Nat Genet* 1994 Feb;6(2):157-62

84. Ana Luisa Weckmann, Gilberto Vargas-Alarcón, Julio Granados. Frequencies of HLA-A and HLA-B alleles in a Mexico City mestizo sample, *American Journal of Human Biology* 1997;9:1-5.
85. A. Arnaiz-Villena, Gilberto Vargas-Alarcón, Julio Granados, Guadalupe Hernández. HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 2000;56:405-416.

APÉNDICE A

Resultados obtenidos durante el proceso de extracción y amplificación de las muestras:

1. En el caso de las muestras sanguíneas elaboradas por la (TÉCNICA DE *BDtract™ GENOMIC DNA ISOLATION KIT*). En las 100 muestras se obtuvo un buen rendimiento de DNA, esto se determino al realizar el corrimiento electroforetico del mismo en un gel de agarosa para genomicos y su posterior revelado con bromuro de etidio, el cual se observo en el Eagle eye still video system (Stratagene), permitiéndonos la observación de la banda de buen peso molecular.
2. Para la cuantificación del DNA extraído, las bandas observadas por los controles standars nos permitió la comparación de nuestro DNA de forma cualitativa y su posterior análisis especrofotometrico lo hizo de forma cuantitativa, esto con la finalidad de determinar de cantidad exacta de DNA necesaria para la amplificación de los productos.
3. Se obtuvieron solo 94 muestras de productos amplificados a los cuales se les aplico un corrimiento electroforetico con la finalidad de observar las bandas de los productos, para su posterior hibridación.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FOTOGRAFIAS TOMADAS DEL CORRIMIENTO EN GEL DE PRODUCTOS

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE B

Análisis estadístico:

Pruebas de Ji Cuadrada

No siempre los datos a analizar provienen de mediciones, es decir, hay ocasiones en que se necesita analizar variables discretas y estas necesitan un trato diferente de las variables continuas.

Algunos ejemplos podrían ser :

- Clasificación de palmas en compactas, supercompactas, normales.
- Clasificación de individuos en muertas, enfermas, sanas.
- Clasificación de individuos por colores.
- Clasificación de individuos en hembras y machos.

Pruebas de frecuencias observadas.

Trata de probar si los resultados a partir de una muestra tienen concordancia con los esperados.

$$\chi^2 = \sum \frac{(o - e)^2}{e}$$

donde "o" es el valor observado para cada una de dos o más clases, y "e" es el valor esperado correspondiente.

Para evaluar esta expresión, primero hay que determinar el valor esperado para cada clase de individuos, de acuerdo al planteamiento de la hipótesis.

Los grados de libertad (Gl) se obtienen restandole 1 al número de categorías.

Haciendo uso de la tabla de probabilidades de χ^2 y con los grados de libertad obtenidos, se determina el valor crítico al nivel de significancia deseado.

Prueba de la Independencia.

Trata de probar si dos variables tienen algún grado de relación o si son completamente independientes.

En el análisis de una relación entre 2 variables, resulta más conveniente plantearse la hipótesis de que ambos son independientes. Para hallar los valores esperados se emplea la teoría de probabilidades que establece : si dos acontecimientos son independientes, la

probabilidad de que ambos ocurran simultáneamente es el producto de sus probabilidades individuales de ocurrir.

Una característica especial de la tabla 2 x 2 es que la diferencia entre lo observado y lo esperado es igual para cada casilla de la tabla, con la excepción del signo.

La fórmula general para determinar los grados de libertad en una tabla de contingencia es :

$(r - 1) * (c - 1)$

donde r son las hileras y c son las columnas.

Y esto nos conlleva a otra consideración: Cuando los grados de libertad den 1, la fórmula general debe ser modificada por la corrección de Yates.

$$X^2 = \sum \frac{(o - e - \frac{1}{2})^2}{e}$$

		Enfermedad	
		(1)	(2)
Prueba	(1)	a	b
	(2)	c	d

Figura 1. Tabla de 2 x 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tablas correspondientes al kit de HLA-B

The image shows three separate tables, each representing a different HLA-B locus. Each table has a grid of cell lines (rows) and probes (columns). The patterns of black squares indicate hybridization results for each cell line across the different probes.

Tabla correspondientes al kit de HLA-DQB1

**Dynal RELI™ 550 HLA-DQB1 (PN R20 01)
Homozygous Hybridisation Patterns**

This table displays the hybridization patterns for homozygous individuals across various HLA-DQB1 alleles. The grid shows which probes hybridize with each allele, resulting in a characteristic pattern of black squares.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla correspondientes al kit de HLA-DRB1

Table 5: QUALITY CONTROL CELL LINE TABLE

Cell line	HLA-B	HLA-C	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DRB1	HLA-DPA1	HLA-DPB1	HLA-DQA2	HLA-DQB2	HLA-DPA2	HLA-DPB2	HLA-DQA3	HLA-DQB3	HLA-DPA3	HLA-DPB3
IM-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-76	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-77	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-92	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-97	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IM-100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GLOSARIO

Acido nucleico. Una gran molécula compuesta de subunidades de nucleótidos.

Adenina. Una base nitrogenada, es un miembro del par de bases A-T (Adenina-Timina).

ADN (ácido desoxirribonucleico). La molécula que contiene codificada la información genética. El ADN es una molécula enrollada en forma de hélice, que se mantiene unida entre sí por medio de enlaces dobles entre los pares de bases o nucleótidos. Las cuatro bases que contiene los nucleótidos en el ADN son: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y Timina (T). En la naturaleza, las pares de bases se forman solamente entre A y T y entre G y C, por lo tanto la secuencia de bases de cada una de las cadenas puede deducirse a partir de uno de sus pares. Ver tipos de ADN.

ADN complementario (cADN). ADN que es sintetizado a partir de esquema de ARN mensajero; con frecuencia la forma de una sola parte de la hélice se usa para probar un mapeo físico.

Alelos. Formas alternativas de un locus genético; un único alelo para cada locus se hereda por separado a partir de cada uno de los padres (p.ej. en el locus para el color de los ojos, los alelos pueden dar resultados de color azul o café).

Alotipo. Proteína codificada por un alelo que puede ser reconocida como un antígeno por otro miembro de la misma especie.

Aminoácido. Una cadena de compuestos proteicos de al menos 20 bases nitrogenadas, que se combinan para formar una proteína. La secuencia de aminoácidos en una proteína están determinados por la acción del código genético.

Amplificación. Un incremento en el número de copias de un fragmento específico de ADN; puede ser in vivo o in vitro. Ver, reacción en cadena de la polimerasa.

Análisis de secuencias de bases. Un método, algunas veces automatizado, para determinar la secuencia de las bases.

Anticuerpo. Molécula producida por los animales como respuesta a un antígeno, que tiene la propiedad de combinarse específicamente con el antígeno que indujo su producción.

Antígeno. Molécula que reacciona con un anticuerpo formado previamente en los receptores específicos de las células T y B.

Antígeno de histocompatibilidad. Antígeno de membrana común a las células nucleadas de un mismo organismo que determina el rechazo de los injertos.

Basófilos. Tipo de leucocito granular, que se caracteriza por la presencia de gránulos de color violeta azulado; son capaces de sintetizar y secretar ciertos mediadores que promueven la inflamación y controlan el curso de la respuesta inmunitaria.

$\beta 2$ Microglobulina: Polipéptido que forma parte de algunas proteínas de membrana entre las que se encuentran las moléculas clase I del MHC.

CD: Son grupos de diferenciación, la sigla proviene del inglés Cluster de diferenciación y se refiere a los grupos de anticuerpos monoclonales que pueden utilizarse para identificar la estirpe o estadio de diferenciación de los linfocitos, y de éste modo distinguir una clase de linfocitos de otra.

CD4: Moléculas que se adhieren a las glicoproteínas clase II del MHC para traducir una señal. Se expresan en las células T restringidas por la clase II del MHC.

CD8: Moléculas que traducen una señal al unirse a las glicoproteínas clase I del MHC y cuya expresión celular está restringida por la clase I del MHC.

Célula. Estructura o unidad orgánica fundamental de los seres vivos, capaz de realizar procesos esenciales de la vida.

Células de LANGERHANS. Células de la piel que presentan antígenos, migran a los ganglios linfáticos y se transforman en células dendríticas. Son muy activas en la presentación de antígenos a las células T.

Células dendríticas. Conjunto de células presentes en los tejidos que capturan los antígenos y migran hasta los ganglios linfáticos y el bazo en donde presentan activamente los antígenos procesados a las células T.

Células presentadoras del antígeno. Macrófagos que presentan el antígeno, a las células inmunes para desencadenar el mecanismo de defensa, creando anticuerpos y ordenando la producción de determinado tipo de células del propio sistema. La célula presentadora de antígenos, como la de Langerhans y dendrítica, digiere los cuerpos extraños y muestra las partes resultantes a otras células del sistema.

Centrómero. Una región especializada del cromosoma en la cual los husos de las fibras se conectan durante la división celular.

Código genético. La secuencia de nucleótidos, codificada en tripletes (codones) a lo largo del mRNA, que determina la secuencia de aminoácidos en la síntesis de proteínas. La secuencia de ADN de un gen puede usarse para predecir la secuencia de mRNA, el código genético entonces puede usarse para predecir la secuencia de aminoácidos.

Codominancia. Estado en que un gen expresa su característica en el heterocigoto de modo equivalente a su par. Los alelos del gen se expresan al mismo tiempo y de modo total en el heterocigoto.

Complemento. Sistema enzimático complejo de proteínas plasmáticas capaz de fijarse sobre un gran número de sistemas antígeno anticuerpo y que desempeña un papel básico en los mecanismos efectores de la inmunidad.

Cromosomas homólogos. Un par de cromosomas conteniendo la misma secuencia lineal de genes, cada uno derivado a partir de uno de los padres.

Cromosomas. La estructura genética con capacidad de autoreplicación de células conteniendo el ADN celular que porta en su nucleótido un arreglo de genes en forma de secuencia. En procariotes, el ADN cromosomal es de tipo circular y todo el genoma es portado por un cromosoma. En eucariotes, los genomas consisten de un número de cromosomas cuyo ADN está asociado con diferentes tipos de proteínas.

Diploide. Un conjunto completo de material genético consistiendo de cromosomas apareados, uno de los cromosomas procedentes de cada conjunto parental. La mayoría de las células animales, excepto los gametos, poseen conjuntos diploides de cromosomas. El genoma diploide de cromosomas del humano tiene 46 cromosomas, mientras que el de bovino posee 60. Comparar con haploide.

Doble hélice. La forma que toman las dos cadenas lineares de ADN cuando están enlazadas conjuntamente.

Enzima. Una proteína que actúa como un catalizador, acelerando la tasa a la cual una reacción bioquímica sucede, pero sin alterar la dirección o naturaleza de la reacción.

Exones. Las secuencias de ADN de una proteína codificante de un gen, o de otra manera son las secuencias que están representadas en el mRNA en el momento que llega a los ribosomas, porque son las regiones del gen que se expresan. Comparar con intrones.

Exonucleasa. Una enzima que penetra o rompe nucleótidos secuencialmente a partir de terminaciones libres de una línea de ácido nucleico sustraído.

FISH (Fluorescencia de hibridación in situ). Un acercamiento de mapeo físico que usa marcas fluorescentes para detectar la hibridación de cadenas prueba con cromatina en cromosomas en metafase y con células somáticas menos condensadas en interfase.

Gene ó Gen. La unidad física y fundamental de la herencia. Es una secuencia ordenada de nucleótidos localizados en una posición particular, sobre un cromosoma particular, que codifica un producto funcional específico (p.e. una proteína o una molécula de ARN).

Genética. El estudio de los patrones de la herencia de las características.

Genoma. Todo el material genético en los cromosomas de un organismo particular, el tamaño de un genoma se da generalmente por el número total de pares de bases.

Globulina. Proteínas del plasma sanguíneo, algunas de las cuales (globulinas gamma) actúan como anticuerpos. **Guanina (G).** Una base nitrogenada, un miembro del par de bases G-C (guanina-citocina).

Haploide. Un solo grupo de cromosomas (la mitad del conjunto completo del material genético) presente en las células cigoto (huevo y espermias) de los animales y en el polen de las plantas. El humano tiene 23 cromosomas en sus células reproductivas, el bovino tiene 30 cromosomas. Ver diploide.

Haplotipo. Combinación, en un individuo concreto, de los alelos de varios genes que están en ligamento en una región cromosómica específica.

Heterodímeros. Molécula formada por dos componentes diferentes, pero estrechamente relacionados, como una proteína compuesta por la unión de dos cadenas separadas.

Heterocigoto. Individuo que posee dos alelos diferentes para un carácter dado en el locus correspondiente de cromosomas homólogos.

Homocigoto. Individuo que posee un par idéntico de alelos en los loci correspondientes de cromosomas homólogos para un carácter dado o para todos los caracteres.

Heterocigocidad. La presencia de diferentes alelos en uno ó más loci, sobre los cromosomas homólogos.

Hibridación in situ. El uso de ADN o ARN prueba para detectar la presencia de una secuencia de ADN complementario en una célula cultivada de eucariote o de una bacteria clonada.

Hibridación. El proceso de unir dos cadenas complementarias de ADN o una de ADN y otra de ARN para formar una molécula de doble cadena.

Inmunidad. Es el conjunto de factores humorales y celulares que protegen al organismo contra un ataque infeccioso o tóxico (con excepción de los fenómenos de tolerancia).

Inmunización. Proceso para iniciar o aumentar la resistencia a una enfermedad infecciosa.

Interferon gamma. Proteína formada durante la interacción de células animales con virus, capaz de conferir resistencia a la infección por una amplia gama de virus a células animales de la misma especie.

Isótopo. Variantes genéticas de una familia de proteínas o péptidos, codificados en el genoma de cada uno de los miembros de determinada especie.

Intrones. La secuencia de bases de ADN que interrumpen la secuencias de proteína codificante de un gen, estas secuencias se transcriben dentro del ARN, pero se cortan fuera del mensaje, antes de que se trasladen como proteínas, razón por la que también se les conoce como secuencias interpuertas. Ver Exones.

Kilobase (kb). Unidad de longitud para los fragmentos de ADN, es igual a 1000 nucleótidos.

Kilodalton. Unidad de masa molecular equivalente a 1.000 daltons. Un dalton es la décima parte de la masa del átomo de carbono y equivale a $1,66 \times 10^{-24}$ g. Su abreviatura es kd.

Ligazón o ligamiento. La proximidad de dos o más marcadores (p. e. genes, marcadores RFLP) sobre un cromosoma; a más unidos o pegados que estén los marcadores, menor será la probabilidad de que sean separados durante los procesos de replicación o reparación del ADN (fisión binaria en procariotes, mitosis o meiosis en eucariotes) y entonces, mayor será la probabilidad de que ellos sean heredados de manera conjunta.

Leucocito. Glóbulo blanco, célula encargada de la defensa del organismo. Los leucocitos se dividen en granulocitos, producidos en la médula ósea, que constituyen la primera línea de defensa del organismo - la cual es inespecífica - y los agranulocitos. Los granulocitos son los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los agranulocitos son los linfocitos y los monocitos.

Linfocito B. Células linfoides productoras de anticuerpos que median la inmunorespuesta.

Linfocito T. Grupo de Linfocitos que se encargan de la inmunidad celular. Se subdividen en: Linfocitos T Cooperadores o T4, también llamados CD4; Linfocitos T Supresores o T8, también llamados CD8 y Linfocitos Citóxicos o T8.

Locus (plural loci). La posición sobre un cromosoma de un gen u otro cromosoma marcado. El uso de locus, a veces está restringido para indicar las regiones de ADN que son expresadas. Ver expresión génica.

Marcador. Una localización física identificable sobre un cromosoma (p. e. sitios de corte de enzimas de restricción, genes) cuya herencia puede seguirse. Los marcadores pueden expresarse en regiones de ADN (genes) o en algunos segmentos de ADN sin una función conocida codificable, pero cuyo patrón de herencia puede determinarse. Ver RFLP, longitud de fragmentos de restricción polimórficos.

Megabase (Mb). Unidad de longitud para los fragmentos de ADN, es igual a un millón de nucleótidos y en forma burda, igual a 1 cM.

MHC. Conjunto de genes que controlan aspectos de la respuesta inmune, produciendo antígenos histocompatibles, que están presentes en todas las células del cuerpo como marcadores para identificarlas como propias.

Mutación. Cualquier cambio heredable en la secuencia de ADN. Comparar con polimorfismo.

Nucleótido. Una subunidad de ADN o ARN que consiste de una base nitrogenada (adenina, guanina, citocina, timina en el ADN, ó adenina, guanina, citocina y uracilo en el caso del ARN) una molécula de fosfato y una molécula de azúcar (desoxirribosa en el caso del ADN y ribosa en el caso de ARN). Millones de nucleótidos se unen o ligan en una molécula de ADN o ARN. Ver ADN, ARN, pares de bases.

Oncógeno. Un gen que está asociado con el cáncer de una o más formas. Muchos oncógenos están involucrados directa o indirectamente, en el control de la tasa de crecimiento celular.

Pares de bases. Dos bases nitrogenadas (Adenina y Timina o Guanina y Citocina) que se mantienen unidas por medio de doble enlaces o puentes. Las dos cadenas de ADN se mantienen unidas en forma de doble hélice por enlaces entre los pares de bases.

Polimorfismo. Diferencias en secuencias de ADN entre individuos. La variación genética que ocurre en mas de 1% de una población se debe considerar como un polimorfismo útil para realizar análisis genético de ligamiento. Compárese con mutación.

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Variación existente entre individuos en tamaños de fragmentos de ADN cortados por enzimas de restricción específicas; las secuencias polimórficas que resultan de los RFLPs se usan como marcadores sobre mapas genéticos ya sean físicos o para los de ligamiento. Los RFLPs generalmente son originados por una mutación en un sitio de corte.

Primers (iniciador). Cadena corta de polinucleótido preexistente a la cual pueden agregársele nuevos desoxirribonucleótidos por la acción de la enzima ADN polimerasa.

Promotor. Un sitio sobre el ADN en el cual la ARN polimerasa se enlaza para iniciar la transcripción.

Proteína. Una gran molécula compuesta de una o más cadenas de aminoácidos en un orden específico; el orden está determinado por la secuencia de bases de nucleótidos en el gen que codifica la proteína. Las proteínas se requieren para la estructura, función y regulación de las células corporales, tejidos y órganos y cada proteína posee funciones únicas. Ejemplos son las hormonas, enzimas y anticuerpos.

Purina. Una base nitrogenada, contiene un solo anillo púrico y la contiene los ácidos nucleicos. La purina en el ADN es la adenina y en el ARN es la guanina.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Un método para amplificar una secuencia de bases de ADN usando una polimerasa estable al calor y dos primers de 20 bases, (iniciadores de secuencias) uno complementario al cabo o extremo positivo (+) y el otro al extremo final (-). Los extremos sintetizados más recientemente de ADN pueden servir como plantillas adicionales para sintetizar la misma secuencia de primers recócidos, cadenas de alargamiento y disociación producidas rápida y altamente específicas de las secuencias deseadas. La PCR también puede usarse para detectar la existencia de la secuencia definida en una muestra de ADN.

Receptor. Molécula en la superficie de la célula que sirve como marcador o sitio para adhesión de antígenos, anticuerpos, otras células o componentes inmunológicos.

Respuesta inmunitaria. Es la organización de una defensa frente a la entrada en nuestro cuerpo de elementos extraños

Secuencia complementaria. Secuencias de bases de ácidos nucleicos que pueden formar una estructura de doble hélice por plantillas de pares de bases; la secuencia complementaria de G-T-A-C es C-A-T-G.

Secuenciación. Determinación del orden de nucleótidos (secuencias de bases) en una molécula de ADN o ARN, o el orden de aminoácidos en una proteína.

Secuencias repetidas en tandem (TRS). Copias múltiples de una misma secuencia de bases sobre un cromosoma; se usa como marcador en mapeo físico.

Sistema inmune. Células y tejidos finos que permiten a seres humanos y a animales montar una respuesta protectora específica a los microorganismos invasores, a los tejidos finos trasplantados y otro material conocido como no nativo por el cuerpo.

Telómero. Las terminaciones de los cromosomas. Estas estructuras especializadas están involucradas en la replicación y estabilidad de las cadenas de las moléculas de ADN.

Timina (T). Una base nitrogenada, un miembro del par de bases A-T (adenina-timina).

Uracilo. Una base nitrogenada normalmente encontrada en el ARN pero no en el ADN, el uracilo forma pares de bases con la adenina.

Virus. Una entidad biológicamente no celular que puede reproducirse solamente dentro de una célula hospedera. Los virus consisten de ácido nucleico con una cubierta de proteína; algunos virus también están protegidos por una membrana. En el interior de la célula afectada, los virus usan la capacidad de duplicarse y sintetizar de la célula hospedera para duplicarse o producir progenie.