UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A LA UNAM

"IDENTIFICACIÓN DE GENES KIR EN GRUPOS ÉTNICOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ROSA JAZMÍN PALMA MARTÍNEZ

DIR. DE TESIS: M. en C. EDUARDO DEL REY PINEDA.
Dra. MARGARITA GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ.

MÉXICO, D.F. 2005.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. en C. Eduardo del Rey Pineda.

VOCAL: Dr. Juan Antonio Giménez Scherer.

SECRETARIO: Q.F.B. Martha Laura Luna Ontiveros.

1er. SUPLENTE: Q.F.B. Gerardo García Camacho.

2º. SUPLENTE: M en Al. María Antonieta Giménez Zamudio.

Sitio donde se desarrolló la investigación:

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional S XXI, IMSS.

M. en C. Eduardo del Rey Pineda.
Director de Tesis

Rosa Jazmín Palma Martínez.
Autoría del Trabajo

Desde niña, quise luchar y seguir el ejemplo de mis padres para ser una buena e importante persona, esto traducido al presente en el proceso de mi vida adulta, deseo con toda mi fuerza, SER una brillante investigadora y esto es apenas el comienzo que con toda voluntad, perseverancia, dedicación y tu fuerza lograré Dios mío ...

Papi: gracias por darme la vida física, moral, académica, por ser mi maestro, mi guardaespaldas pero sobre todo gracias por la confianza para ser también mi amigo. Te admiro y te respeto.
Mami: gracias por darme la vida física, moral académica, pero mil gracias por ser más que una madre, gracias por ofrecerme tu amistad incondicional para ser como una hermana en complicidad en todos mis actos.

Papás: gracias por darme la mejor herencia que una persona puede recibir.... Mi educación. Gracias por darme las suficientes bases morales, gracias por cuidarme y amarme como la más preciada de sus joyas. Pero sobre todo gracias por enseñarme que ser padres va más allá de dar la vida. Pueden sentirse seguros de que han cumplido a la perfección la profesión más difícil de la vida de ser padres, y yo puedo sentirme orgullosa de la sabiduría con la que han podido realizarla.

Hermano "dino": gracias por ser mi perro guardián con el respeto que me mereces, fuiste un ejemplo para mí en mi trayectoria académica y eres una de las personas de las cuales no me quisiera separar nunca.
Hermano "roger": eres mi ejemplo perfecto de LUCHA, de nobleza y de amor a la vida y a la gente.
Tere: para mí aparte de integrarte a nuestra familia, te estás convirtiendo en una hermana, la que no tuve y siento que estoy comenzando a tener, por lo anterior, gracias de corazón.

Familia: LOS AMO CON TODA MI ALMA...Por siempre en mi vida y en mi corazón.

Jazmín.

Gabriela Sánchez Ramírez alias "gabrielita" gracias por enseñarme a reír, a estornudar, a derramar miel, a patentar mis frases célebres, gracias por cuidarme y defenderme a capa y espada, pero sobre todo gracias por ser mi AMIGA incondicional. Te quiero para toda la vida!

A mis amigos y amigas que toleraron mi falta de atención y tiempo hacia ustedes, mil gracias por demostrarme su honesta y sincera amistad. Ahora les digo que este documento es el culpable.

Sexto Sínodo: A la Dra. **Carolina Barrientos Salcedo** por aconsejarme e introducirme en el ámbito científico del Centro Médico Siglo XXI, por ser una guía fundamental en la realización de esta tesis y por compartirme su alegría y sincera amistad.

Al Dr. Miguel Cruz por permitir integrarme a su Unidad de Investigación y por el gran apoyo y confianza que en su mejor momento me brindó.

A la Dra. Margarita Gutiérrez por aceptarme a colaborar en el proyecto de investigación que dio lugar a la realización del presente trabajo.

A la Dra. Rosenda Peñaloza y Dra. Leonor Buentello por colaborar en la realización de este proyecto de investigación proporcionándonos parte del material de trabajo para dicha investigación y a todos mis compañeros de la UIM en Bioquímica del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI.

A la UVM por brindarme excelentes maestros que más allá de compartir y enseñar sus conocimientos, me brindaron su amistad y me permitieron conocer su calidad humana y profesional. Asimismo, gracias también a la gente administrativa: Alex, Alicia y Raúl, de la UVM que colaboraron en los trámites para la realización de esta tesis.

De manera especial quiero hacer un agradecimiento profundo a todas y cada una de estas personas que me han brindado su desinteresado apoyo y han contribuido a mi formación académica y ética, pero más que nada, por mostrarme su calidad humana. Créanme que a pesar del transcurso del tiempo, nunca los dejaré de llevar en mi mente: José Manuel Galindo, Enrique Villa, Alberto Marroquín, Alfredo Alagunas, Genaro Vargas, Jair Lozano, Vinicio Granados, Guadalupe Vidal, Mario Ortiz, Carlos Argüelles, Elena Zambrano, Rossana Rodríguez y Victor Ontiveros.

Y a ti que estás leyendo este trabajo de tesis…

ÍNDICE

ABREVIATURAS

Ags	Antígenos
cDNA	DNA obtenido a partir de RNA
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DAP-12	Proteína adaptadora o activadora de 12 kD
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato (bases nitrogenadas)
FA	Frecuencia alélica
HLA	***Human leukocyte antigens*** ó Antígenos de histocompatibilidad humanos
Ig	Inmunoglobulina
IFNγ	Interferón gamma
ITIM	***Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*** ó Regiones del immunoreceptor de inhibición basado en tirosina
ITAM	***Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*** ó Regiones del immunoreceptor de activación basado en tirosina
KIR	***Killer cell immunoglobulin-like receptors*** ó Receptor tipo Inmunoglobulina (proteína)
KIR	***Killer cell immunoglobulin-like receptors*** (grupo de genes tipo inmunoglobulina)
Kb	Kilobases
kD	Kilodaltones
Locus	Región
Loci	Regiones

LTC	Linfocito T citotóxico (CD8+)
LCR	***Leukocyte Receptor Complex*** ó Sistema receptor leucocitario
MHC	***Major histocompatibility complex*** ó Sistema mayor de histocompatibilidad
Mb	Megabase (un millón de pares de bases)
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
MIC	***MHC class I- related molecules*** o moléculas relacionadas con MHC de clase I
µl	Microlitro
NK	***Natural Killer***, células NK, linfocitos NK ó células agresoras naturales
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
ng	Nanogramos
n	Tamaño de la muestra
OD	Densidad óptica
PCR-SSP	***PCR sequence-specific priming*** ó Reacción en Cadena de la Polimerasa con iniciadores específicos
Primer	Oligonucleótido
pM	Picomolar
pb	Pares de bases
RNA	Ácido Ribonucléico
TCR	Receptor de células T

TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Taq	Enzima aislada de la bacteria *Thermophyllus aquaticus*
TBE	Trizma, ácido bórico y EDTA
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

Las células "Natural Killer" (NK) expresan en su membrana plasmática al receptor tipo inmunoglobulina (*KIR*) codificado por una familia de genes altamente polimórficos que se localizan en el cromosoma 19q13.4. Estos receptores tienen un papel importante en el control de la respuesta inmune, lo cual podría explicar algunas asociaciones observadas entre ciertos genes *KIR* y enfermedades como artritis reumatoide, artritis soriática e incluso en el control del desarrollo de la enfermedad del VIH. En diversas poblaciones del mundo se ha identificado una gran variedad de polimorfismos de los genes *KIR* en cada individuo, pero no se ha hecho en nuestro medio. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar la frecuencia de polimorfismos de los genes *KIR* en las células NK en dos poblaciones indígenas mexicanas. Se realizó la amplificación de la región correspondiente a los genes *KIR* mediante la técnica de PCR-SSP con "primers" específicos a partir de muestras de DNA previamente extraídas y purificadas de 55 individuos sanos, no relacionados, provenientes de dos grupos étnicos: Nahuas de Zitlala, Guerrero y Purépechas de San Andrés Tzirandaro, Michoacán. Se identificaron 10 genes *KIR*: 6 inhibidores (*2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1* y *3DL3*) y 4 activadores (*2DS1, 2DS4, 2DS5* y *3DS1*). Para los genes inhibidores *KIR2DL1, 2DL3* y *3DL1* se determinaron alelos (5 para el primero, 3 para el segundo y 5 para el tercero), mientras que para el resto de genes estudiados sólo se identificó la presencia o ausencia del gen.

Los genes inhibidores *KIR2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1* y *3DL3* fueron los que más predominaron en ambas poblaciones (75-95%), a excepción de *KIR2DL5* (40%). El gen *KIR2DL1* se identificó en todos los individuos estudiados (100%). Respecto a los genes activadores, los 4 identificados (*2DS1, 2DS4, 2DS5 y 3DS1*) se encontraron en baja frecuencia en la población indígena (menos del 25%), excepto el gen *2DS4* que se encontró en un promedio del 50% en la población estudiada. También se identificaron alelos para los genes inhibidores *KIR2DL1, 2DL3* y *3DL1*. En el gen *KIR2DL1* se determinaron tres alelos predominando el *003 (76–96%), siguiéndole el *002 (4–20%) y por último el *004 (5%) presente únicamente en Nahuas. Para el gen *KIR2DL3* se identificaron dos alelos (*001 y *002/006) siendo el más frecuente el *001 en ambas poblaciones (93 – 95%). Finalmente se identificaron dos alelos (*002/008 y *005) en el gen *KIR3DL1*, encontrándose en mayor proporción el *002/008 (80 – 84%) en las dos poblaciones. Los datos de nuestro estudio han permitido conocer la frecuencia de estos genes en poblaciones indígenas mexicanas. Además, los datos sugieren que, una vez establecido el repertorio de genes *KIR* en cada individuo, será posible determinar implicaciones funcionales relacionadas con susceptibilidades hacia algunas enfermedades.

ABSTRACT

Natural Killer (NK) cells express the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) in their surface. These receptors are encoded by a family of highly polymorphic genes localized at the chromosome 19q13.4. These receptors play a significant role in the immune response control, which may explain some observed associations between *KIR* genes and diseases such as rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and control of HIV disease progression. Great variability in polymorphisms of *KIR* genes has been observed in several world populations; however, there is no information about these genes in Mexican population. Accordingly, the purpose of this study was to assess the polymorphism frequency of *KIR* genes in NK cells of two Mexican ethnic groups. Amplification of the *KIR* genes locus was carried out by PCR-SSP with specific primers method of previously extracted and purified DNA samples of 55 healthy individuals, unrelated from two ethnic groups: Nahuas from Zitlala, Guerrero and Purépechas from San Andrés Tzirandaro, Michoacán. Ten *KIR* genes were identified: 6 inhibitors (*2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1* and *3DL3*) and 4 activators (*2DS1, 2DS4, 2DS5* and *3DS1*). For the inhibitors genes *KIR2DL1, 2DL3* and *3DL1* alleles were determined (5 for the first, 3 for the second and 5 for the third), while for all of them, there were identified just the presence or absence of the gene. The most frequent genes present in both ethnic groups were the inhibitors genes *KIR2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1* and *3DL3* (75-95 %), with exception of *KIR2DL5* (40%).

KIR2DL1 gene was identified in all studied subjects (100%). The four activator genes identified (*2DS1, 2DS4, 2DS5* and *3DS1*) were found in a low frequency in the ethnic groups (less than 25%), with exception of *2DS4* which was found in 50% of the studied population. In addition, some alleles were identified in the inhibitor genes *KIR2DL1, 2DL3* and *3DL1*. For *KIR2DL1* gene three alleles were identified, being the most frequent the *003 (76-96%), followed by the *002 (4–20%) and finally the *004 (5%) only present in the Nahuas group. Two alleles were identified (*001 y *002/006) in the *KIR2DL3* gene, being the most frequent the *001 in the studied population (93 – 95%). Finally, two alleles were identified (*002/008 y *005) in the *KIR3DL1* gene. The most frequent allele in our population was the *002/008 (80 – 84%). Data have allowed us to know the frequency of these genes in two Mexican ethnic groups. Moreover, data suggest that, once established the *KIR* repertory in each individual, it would be possible to determine functional implications related whit susceptibilities to some diseases.

1. MARCO TEÓRICO

1. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES.

A. Generalidades

La genética es una especialidad singular entre las diversas disciplinas de la medicina porque centra su atención en familias, en lugar de hacerlo en un paciente individual. La **genética poblacional** es el estudio de la distribución de las variantes (alelos) de los genes en las poblaciones y de la manera en que las frecuencias de genes y genotipos se mantienen o cambian (Thompson et al., 1996).

Un **gen** se define como la secuencia de DNA cromosómico de un tamaño variable medido en pares de bases, que contiene la información requerida para fabricar un RNA mensajero y a través de éste una proteína (Robertis, 1996). Los **alelos** son formas alternas de un gen que difieren en secuencia o función; son variantes de un gen en un cromosoma. Cada juego completo de alelos codificados en cada uno de los cromosomas heredados de un progenitor se denomina **haplotipo**. El **genotipo** esta dado por los alelos localizados en una región o locus (sitio de un cromosoma donde se localiza un gen determinado) particular en el cromosoma de un individuo.

La estructura genética de las poblaciones naturales se aleja de muchas de las condiciones ideales, es decir, las poblaciones no tienen un tamaño constante, ni tienen siempre los mismos tipos de apareamientos, ni están sujetas de manera uniforme a condiciones constantes de mutación, migración y selección. También es evidente que, debido a la existencia de alelos múltiples, hay normalmente más de tres genotipos diploides para cualquier locus y que, debido a la interacción, la eficacia biológica de estos genotipos debe depender de genes situados en otros loci.

Debido al efecto de la selección natural durante largos períodos de tiempo, se puede considerar que muchas poblaciones han adquirido fenotipos que están óptimamente adaptados a su ambiente. Es decir, muchos fenotipos tenderán a agruparse alrededor de algún valor para que la eficacia biológica sea máxima. Por consiguiente, puede esperarse que los individuos que se alejan de estos fenotipos óptimos posean una menor eficacia biológica que aquellos más próximos a los valores óptimos (Strickberger, 1988).

La información sobre la estructura genética del mexicano proviene de dos tipos de estudios: unos con orientación fundamentalmente médica, como son las investigaciones sobre errores congénitos del metabolismo o aberraciones cromosómicas (entre otras), y otros con orientación antropológica, realizados con el objeto de caracterizar biológicamente a determinadas poblaciones. Ambos estudios tienen relevancia desde el punto de vista médico.

Los tres requisitos que idealmente debiera tener una medición para describir biológicamente a un grupo humano, son: *a)* que en su expresión intervenga poco o nada el medio: *b)* que permanezca sin cambio durante la vida de los individuos, y *c)* que se conozca su modo de herencia (Lisker, 1981).

B. Poblaciones Humanas

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

En el periodo glacial más reciente, hace 10,000 años aproximadamente, la masa terrestre euroasiática, en la que se habían desarrollado asentamientos humanos pequeños y esparcidos, se dividió en tres regiones distintas separadas por áreas glaciales montañosas que constituyeron barreras físicas para la comunicación y el apareamiento. Se cree que en estas regiones geográficas y, por tanto, genéticamente aisladas unas de otras, se desarrollaron los tres grupos raciales principales. Después cada grupo se subdividió cada vez más en numerosas subpoblaciones distintas, a menudo denominadas **grupos étnicos**, con sus propios conjuntos característicos de frecuencias génicas (Thompson et al., 1996).

C. Estratificación

Una población estratificada es aquella que contiene varios subgrupos que se han mantenido genéticamente diferenciados a lo largo de la evolución. En todo el mundo existen numerosas poblaciones estratificadas; por ejemplo, la población de Estados Unidos se estratifica en dos subgrupos principales, individuos de razas blanca y negra, y varios subgrupos más pequeños, que incluyen **americanos indígenas**, asiáticos e hispánicos. Cuando la selección de uniones en una población mixta se restringe a los miembros del mismo subgrupo, el resultado es un exceso de homocigotos y una deficiencia correspondiente de heterocigotos en la población general para cualquier locus con más de una alelo.

El conocimiento de la estratificación puede ser relevante en algunas situaciones clínicas. Así, no sólo varía la frecuencia, sino también los alelos mutantes específicos de diferentes trastornos genéticos entre grupos poblacionales, por lo que cada grupo poblacional posee sólo unos pocos alelos comunes, además los alelos frecuentes en una población resultan escasos en otras (Thompson et al., 1996).

D. Aspectos sobre la cultura de pueblos indígenas mexicanos

En la mayor parte de los estudios se caracteriza a los grupos indígenas por su lengua ya que es uno de los rasgos culturales más importantes que identifica y da cohesión a aquellos que la comparten. Según Swadesh 1959, las lenguas indígenas de México se clasifican en cuatro grandes grupos que son: Joca-Meridional, Otomangue (Otomíes), Nahua-Cuitlateco (Nahuas y Huicholes) y Maya-Totonaco (Purépechas o Tarascos) (Scheffler, 1999).

a. Nahuas

El nombre del grupo náhuatl proviene del verbo nahuatli (hablar con claridad); este término se emplea para designar tanto al grupo como al lenguaje de los mexicas, los mexicanos. El grupo nahua es el más numeroso de México, sus miembros viven en diferentes estados del país; en Puebla, Veracruz, Hidalgo, San Luis Potosí, Tlaxcala, Morelos, el Estado de México, Distrito Federal con 83,064, y Guerrero con 128,192 habitantes (**Figura 1**). En menor proporción se localizan en Oaxaca, Jalisco y Michoacán.

La lengua náhuatl se encuentra dentro de la subfamilia "aztecoide" que pertenece a la familia o grupo yuto-azteca. Este grupo de lenguas emparentadas se habla desde las mesetas de la gran Cuenca del Oeste de los Estados Unidos hasta algunas regiones de Nicaragua. Dentro del territorio mexicano el náhuatl es el idioma con mayor número de hablantes del grupo yuto-azteca. Según sus características lingüísticas, el náhuatl se ha dividido en cuatro grupos: el del este, del oeste, el central y el septentrional, el de Morelos pertenece al segundo que utiliza la "tl" al final y usa como prefijo el pretérito. La salud entre los pueblos Nahuas de Morelos significa estar en las mejores condiciones físicas, psíquicas y espirituales para llevar a cabo todas sus actividades.

La enfermedad es tratada dentro del grupo doméstico por terapeutas tradicionales o a través de la medicina institucional. Las amas de casa y los médicos tradicionales recurren a plantas medicinales y masajes, así como a una cuidadosa selección de los alimentos, de acuerdo con su calidad de fríos o calientes, dependiendo también de la naturaleza de la enfermedad, además de llevar a cabo diversos rituales de curación. Los especialistas tienen distintos niveles de iniciación y entrenamiento. En algunos casos la medicina tradicional se ha combinado con prácticas modernas alópatas, y en otros, de lo tradicional han pasado a las microdosis. Los médicos tradicionales son consultados por gente de sus propias comunidades, de otros estados y uno que otro extranjero.

En los pueblos Nahuas de Morelos la principal actividad económica es la agricultura para la cual se emplean varios agroquímicos. En Hueyapan, con una población de 6,500 habitantes, se practica la agricultura, que se destina para el autoconsumo (maíz y frijol) y para el comercio (hortalizas y frutas como pera, durazno, tejocote, aguacate y membrillo); el principal problema productivo que tienen es que los árboles ya son viejos y muchos de ellos están infestados de plaga. Los terrenos agrícolas y los pastizales son de propiedad ejidal, comunal o pequeñas propiedades.

Otras actividades económicas importantes son la elaboración de artesanías textiles, de muebles y el pequeño comercio que abastece de lo indispensable a la región.

La autoridad está a cargo del ayudante municipal o del delegado, además del Juez de Paz quien trata los asuntos judiciales.

Actualmente, la relación entre los cargos religiosos y los civiles no es tan estrecha como lo fue en años anteriores. Sólo en algunos de estos pueblos se reconoce aún a los huehuechiques, ancianos prestigiados, que fungen como consejeros de los jóvenes en víspera de casarse, y de la población en general. Los Nahuas de Morelos, ya sea que hablen su lengua o no, conservan en gran medida los conocimientos de sus antepasados. Su visión del mundo, de la naturaleza, de Dios, la forma de elegir a sus representantes, sus ritos agrícolas de petición de agua, sus procesiones a los lugares sagrados, sus danzas, su música, sus recuerdos sobre un pasado cercano lleno de posibilidades ecológicas y abundancia de recursos frente a la pobreza económica y las carencias en las que viven actualmente (Saldaña Fernández, 2005).

b. Purépechas o Tarascos

Este pueblo indígena habita las regiones lacustre y montañosa del centro de Michoacán en un territorio que abarca la sierra, la cañada y algunos valles de la zona lacustre. Se llaman así mismo "purhépecha" y cada uno de sus integrantes es un "purhé" o "puré" que significa gente o persona; esto implica una autoafirmación como seres humanos y pueblo en general. Desde la conquista y hasta hace unos cuantos años, este pueblo era conocido como tarasco; sin embargo, esta denominación es externa y les fue impuesta por los conquistadores. El área purhé actual se extiende a lo largo de 6,000 km^2 de los 60,000 que tiene el estado de Michoacán, en la región norcentral de la entidad (**Figura 1**). Esta área se ubica entre los 1,600 y 2,600 metros sobre el nivel del mar y se le denomina Porhépecheo o Purhépecherhu, que significa "lugar donde viven los purhé". El área se ha subdividido tradicionalmente en cuatro regiones: Japóndarhu (lugar del lago), Eráxamani (Cañada de los once pueblos), Juátarisi (Meseta), la ciénega de Zacapu y antiguamente se agregaba otra región: Jurhío (lugar de la tierra caliente). La población purhépecha se concentra sobre todo en 22 municipios: Coeneo, Charapan, Cherán, Chilchota, Erongarícuaro, Los Reyes, Nahuatzen, Nuevo Parangaricutiro, Paracho, Pátzcuaro, Periban, Quiroga, Tancítaro, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tingambato, Tinguindín, Tocumbo, Tzintzuntzan, Uruapan, Zacapu y Ziracuaretiro. Sin embargo, las personas que hablan la lengua purhé se distribuyen en 95 de los 113 municipios del estado.

Las localidades indígenas se caracterizan por tener un asentamiento de tipo compacto; hay municipios y poblados que tienen anexos, esto es, localidades periféricas con unas cuantas viviendas, por lo que en tal caso, se puede hablar de asentamientos mixtos. La población mestiza vive sobre todo en los centros urbanos que rodean el área. Con respecto a los servicios de salud, las poblaciones medianas y pequeñas del área cuentan generalmente con clínicas de la Secretaría de Salud o unidades médicas rurales del IMSS-Solidaridad.

El idioma purhé no tiene parentesco lingüístico cercano con ninguna de las lenguas originales que se hablan en México. Se reconocen tres variantes dialectales: la de la región lacustre, central y serrana. Sin embargo, estas variantes dialectales no impiden la comunicación de una zona a otra. En el registro de los censos se puede apreciar la sensible disminución de las personas que hablan la lengua purhé a lo largo del tiempo; sin embargo, a partir de 1980 ha dado inicio un movimiento de apoyo a través de la Academia de la lengua purhé y el trabajo del Centro de Investigaciones de la Cultura purhépecha, para el fortalecimiento de esta lengua con el establecimiento de su abecedario. La salud es considerada por los purhépechas como un resultado de la armonía con la naturaleza y del cumplimiento de las normas comunitarias y familiares.

En relación con la medicina tradicional encontramos diversas especialidades entre los terapeutas, la mayoría de los cuales son mujeres mayores de 55 años y entre quienes encontramos: curanderos (tsinájpir, xurhríjki, eshperi), parteras (pikurpiri), sobadoras (parhíjpiri), brujos (sïkuame), hueseros (sesi atsintani unicha, jururuntani unï), hierberas (uitsákua mítiasti, uitákua jamantspini) y finalmente los mollereros (ukata). Las principales causas de demanda de atención de la población en materia de salud son afecciones de: la rinofaringitis, gastroenteritis y padecimientos osteomusculares.

Los purhépecha-uanacaze establecieron su señorío en Tzintzuntzan, Ihuatzio y Pátzcuaro, desde donde empezaron a extender sus dominios a la región del río Balsas, Jalisco, Colima, Zacatula y Guanajuato; en el oriente se aliaron a los matlatzincas para pelear contra los mexicas. Estos últimos pretendieron someterlos, por lo que se dieron grandes batallas desde mediados del siglo XV entre mexicas y purhépechas, a pesar de lo cual el área purhé nunca fue sometida al dominio mexica.

Después de 1940 es notable el incremento de la migración de la población purhé hacia Estados Unidos; en algunas comunidades la población migrante asciende al 25% o 35%. Estos trabajadores migrantes contribuyen económicamente de manera importante en la realización de obras públicas en sus comunidades de origen. También existen autoridades oficiales, entre quienes destacan el jefe municipal de tenencia, los jueces, el representante de bienes comunales, el consejo de vigilancia y el juez del registro civil, entre otros. Este pueblo concebía que su origen era divino, por eso en el libro denominado "La Relación de Michoacán" la historia comienza en el cielo y la segunda parte continúa en la tierra (Argueta, 2005).

Figura 1. Localización de los grupos étnicos estudiados en la República Mexicana.

E. Fenotipos y Genotipos

Si bien se quiere conocer el genotipo (alelos presentes en un locus) de una persona para determinar con precisión los riesgos de recurrencia, en la mayoría de las ocasiones sólo el fenotipo puede observarse y medirse de manera directa ya que está definido por las características bioquímicas, fisiológicas y morfológicas de un individuo y en un sentido más limitado, por la expresión de algún gen o genes determinados. Así, se requiere utilizar las cifras de frecuencia de una enfermedad hereditaria u otro rasgo genético para calcular las frecuencias alélicas individuales. Para realizar esto se requieren conocimientos sobre la presencia de los genes en las poblaciones y su transmisión de generación en generación. Cuando se habla de la frecuencia poblacional de un gen, se considera como un acervo génico que contiene todos los alelos en un locus particular para toda la población. Una consecuencia importante de las relaciones entre fenotipo, genotipo y frecuencias alélicas es que las proporciones de los genotipos no cambian de generación en generación.

F. Polimorfismo Genético

Muchos loci se caracterizan por tener cierto número de alelos relativamente comunes que permiten clasificar a los miembros de una población natural en fenotipos muy distintos. El **polimorfismo genético** se define como la presencia de alelos múltiples en un locus, en el que al menos dos alelos aparecen con frecuencias mayores al 1%. Por lo tanto por convención, los **loci polimórficos** son aquellos en los que al menos 2% de la población es heterocigótica (genotipo con dos alelos diferentes en un locus determinado en un par de cromosomas homólogos). Sin embargo, debido a que muchos loci polimórficos se caracterizan por un gran número de alelos diferentes, la proporción de heterocigotos para estos loci resulta mucho mayor. De nuevo por convención, los alelos con frecuencias menores a 1% se denominan **variantes raras** (Thompson et al., 1996).

A lo largo de los años, se han detectado un gran número de enzimas y otras proteínas humanas en diferentes poblaciones. Se ha encontrado que una tercera parte de todos los loci examinados muestra polimorfismo detectable al menos en un grupo étnico o racial importante y, con frecuencia, en los grupos poblacionales más numerosos (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1971).

La amplia incidencia de polimorfismo genético implica que cualquier individuo probablemente sea heterocigoto para muchos loci génicos diferentes (Thompson et al., 1996).

2. INMUNIDAD.

A. Generalidades

La humanidad siempre ha sido afectada por enfermedades que en forma de epidemias han eliminado a comunidades enteras. En el pasado, las enfermedades y las epidemias eran consideradas como maleficios o como castigos divinos. Esta idea fue enérgicamente rechazada por Hipócrates, el famoso médico griego nacido en el año 460 a.C., quien sostuvo que las enfermedades eran ocasionadas por factores tales como el clima (el frío, el calor o los vientos), el agua, la tierra, la comida y los hábitos de vida de los individuos. Se sabía que algunas enfermedades podían transmitirse de una persona a otra cuando convivían en estrecha proximidad o cuando hacían uso indiscriminado de utensilios o ropa de uso personal. Así nació el concepto de contagio y la idea de que las enfermedades podían ser causadas por microbios, organismos invisibles al ojo humano.

El descubrimiento de algunos de los gérmenes causantes de enfermedad fue la aportación a la medicina de los primeros "cazadores de microbios" dentro de los que estuvieron Hans Armauer Hansen, descubridor del bacilo de la lepra (1873), y Robert Koch, descubridor del bacilo de la tuberculosis (1882), por citar sólo a dos de los pioneros en este campo.

Aun más antigua era la noción de que una persona que desarrollaba una enfermedad y luego se recuperaba de ella, difícilmente volvía a contraer la misma enfermedad, al menos en el corto plazo.

Así, poco a poco se fueron describiendo una serie de fenómenos biológicos en donde los términos de *inmunidad* y *respuesta inmunitaria* fueron cada vez más frecuentes.

Hoy en día, se denomina inmune a aquel que habiendo padecido una infección, mantiene luego una defensa permanente contra los gérmenes que la provocaron. La capacidad de un individuo para mantenerse libre de infección depende tanto de su resistencia natural o inmunidad innata como de la resistencia que pueda desarrollar o adquirir durante su vida (inmunidad adquirida). La inmunidad innata no requiere del contacto previo con el agente infectante y funciona de manera no específica. La inmunidad adquirida, en cambio, sólo se genera después del contacto con el agente y es específica para el mismo (Rojas-Espinosa, 2001).

B. Tipos de inmunidad

a) Natural: corresponde a las barreras de protección generales inespecíficos (piel, mucosas, saliva, etc.) y no responde a estímulos específicos.

b) Adquirida: es la que se obtiene por medio de un proceso estímulo-respuesta. Puede ser activa, cuando el organismo produce sus propios efectores inmunológicos, o pasiva, cuando recibe anticuerpos ajenos formados en otro organismo o huésped por tratamiento con antisueros o sueros inmunes (Farrera-Rozman, 1995).

3. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC).

El MHC por sus siglas en inglés (*major histocompatibility complex*) es un conjunto de más de 1,000 genes alineados en una región grande y continua del genoma, estrechamente ligados y muy polimórficos, que deben su nombre a su participación en la aceptación o rechazo en el transplante, de los cuales un poco más de 40 codifican para antígenos de leucocitos y participan, en diversas formas, en la respuesta inmunitaria.

En la especie humana la codificación genética del MHC se localiza en el cromosoma 6 y se conoce como región HLA (*human leukocyte antigens*). Este conjunto de genes se encuentra presente en casi todas las células del organismo y constituye la tarjeta de presentación de cada ser vivo individual, por lo tanto ayuda a distinguir lo propio de lo ajeno.

De las 3 clases de genes existentes de MHC ó HLA, la del tipo I (tema de nuestro interés) codifica para antígenos que constituyen una parte integral de la membrana plasmática de las células nucleadas, dando lugar a diferentes tipos de moléculas: MHC-A, MHC-B y MHC-C (Thompson et al., 1996). Estas moléculas se unen a péptidos antigénicos y los presentan a los linfocitos T citotóxicos (LTC).

4. CÉLULAS NK DE LA INMUNIDAD INNATA.

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

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

Las células NK son un subgrupo de linfocitos que se encuentra en la sangre y los tejidos linfoides, especialmente en el bazo, constituyen del 5 al 16% del total de los linfocitos de la población sanguínea (Abbas, 1995). Estas células derivan de la médula ósea y parecen linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos, por lo que a veces se les llama linfocitos granulares grandes (Abbas, 1995; **Figura 2**). Las células NK son una primera línea de defensa importante contra la aparición de células malignas y células infectadas por virus, bacterias y protozoarios (Chapel, 1999).

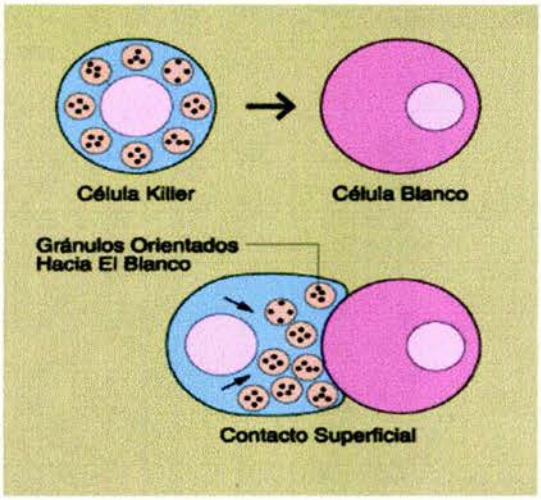


Figura 2. Las células NK forman un grupo distinto de linfocitos granulosos grandes que, como los linfocitos T citotóxicos, emplean gránulos citoplasmáticos que contienen perforinas y granzimas para matar a las células malignas o infectadas. Palma (2004).

A las células NK se les considera como LTC filogenéticamente primitivos, que carecen de TCR (receptor de células T) específicos para el reconocimiento del antígeno. Las células NK poseen la capacidad de matar a ciertas células tumorales y normales infectadas por virus. La lisis que realizan las células NK no es específica para determinantes antigénicos virales particulares. Tal lisis es "natural" en el sentido de que no es inducida por antígenos específicos, por lo que es parte de la inmunidad natural y no de la específica. Aunque la especificidad de objetivos de las células NK es más amplia que la de los LTC, no es aleatoria, las células NK pueden lisar células normales infectadas por algunos virus, pero no por otros, y no lisarán células no infectadas. La lisis generada por la célula NK implica mecanismos similares a la de los LTC, sobre todo la exocitosis de gránulos, la inducción de la fragmentación de DNA, y la apoptosis. Los gránulos NK, como los de los LTC, contienen proteínas formadoras de poros, citotoxinas, esterasa serina y proteoglicanos (Abbas, 1995).

Las células NK no maduran en el timo y pueden aumentar en animales sin timo, además no expresan moléculas CD3; sin embargo, si expresan la molécula CD2 (Abbas, 1995).

Las células NK circulan en un estado de "listas para actuar", lo cual las capacita para entrar y defender un tejido tan pronto como éste llegara a estar dañado o infectado, produciendo citocinas (producidas por células T $CD4^+$) como IFNγ (interferón gamma) ó TNFα (factor de necrosis tumoral alfa) entre otras, lo cual le permite activar otros mecanismos de inmunidad tanto innata como adquirida si se requiriera, causando toxicidad directa. De este modo, las células NK funcionan como puente entre los sistemas inmunitarios innato y adquirido al actuar como una línea de defensa frontal mientras se producen citocinas para promover el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica (García-Miss et al., 2004). Ambos mecanismos efectores se activan por la interacción de sus receptores de membrana.

5. RECEPTORES DE LOS LINFOCITOS DE LA INMUNIDAD INNATA.

La actividad citotóxica de las células NK está regulada por receptores que pueden reconocer tanto determinantes MHC de clase I clásicos (HLA-A, B y C) y no clásicos (HLA-G), como ligandos relacionados con MHC (MIC, *MHC class I-related molecules*). Se han identificado dos familias de receptores: los **receptores KIR**, estructuralmente relacionados con las inmunoglobulinas (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), y los receptores tipo lectina, también llamados NCR (*natural cytotoxicity receptors*), dentro de los que están NKG2D, Ly49 y otros. Los receptores pueden ser activadores o inhibidores; los receptores activadores poseen regiones ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) mientras que los receptores inhibidores poseen secuencias ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) reclutadoras de fosfatasas (Rojas-Espinosa, 2001).

A. Receptores activadores

Para la activación de linfocitos NK es necesario el acoplamiento de sus receptores activadores con el ligando respectivo en la célula "blanco" (Long and Wagtmann., 1997). Esta interacción específica proporciona el estímulo requerido para la producción de sus citocinas y su actividad citotóxica. El proceso es regulado por receptores inhibidores y citocinas que aumentan, limitan o terminan la respuesta (Lanier., 1998).

B. Receptores inhibidores

Desde que los linfocitos NK se descubrieron quedó claro que destruyen únicamente células "blanco" que carecen de MHC I apropiado (**Figura 3**) (Mandelboim et al., 1999).

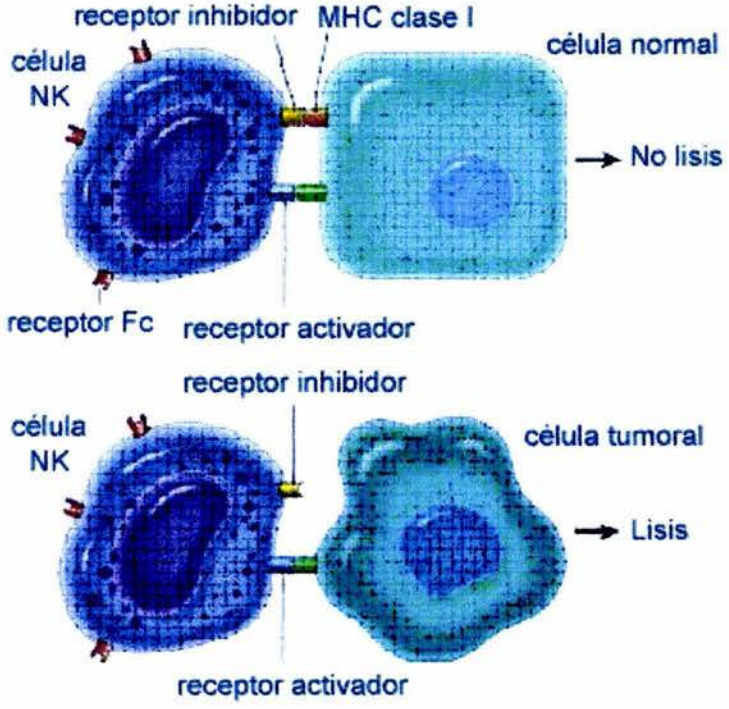


Figura 3. Las células NK se inhiben por las moléculas del MHC-I y se expresan en su ausencia; matando de forma preferente células diana que expresen poco o ningún tipo del MHC clase I. Palma (2004).

Actualmente se sabe que los tumores murinos que carecen de moléculas MHC clase I, son atacados de manera preferente por los linfocitos NK, *in vitro* y/o *in vivo*. Basado en esto, se ha propuesto la hipótesis de la "pérdida de lo propio". Esta hipótesis establece que los linfocitos NK pueden detectar en su célula "blanco" moléculas de MHC I anormales e iniciar su eliminación (Colonna et al., 1998). De esta manera las células "blanco" susceptibles de ser destruidas por las células NK están caracterizadas por la expresión defectuosa de uno o más alelos de MHC I (Moretta et al., 1996). La pérdida de la molécula MHC I ocurre frecuentemente en algunas infecciones por virus (Seaman, 2000). Debido a esto, líneas tumorales como la K562 (derivadas de pacientes con leucemia mielocítica crónica), Molt 4 (leucemia linfoblástica aguda) o Daudi (linfoma de Burkitt), son usadas comúnmente como "blanco" para ensayos con células NK, ya que no expresan MHC I (Robertson and Ritz., 1990). Los linfocitos NK humanos destruyen líneas celulares linfoblásticas transformadas que tienen MHC I deficiente, pero estos linfocitos NK son incapaces de matar estas células "blanco" cuando son mezcladas con genes HLAB y HLA-C normales (Lanier., 1998). Por otra parte, ésta hipótesis de la "pérdida de lo propio" no excluye la posibilidad de que células con moléculas MHC I normales puedan ser destruidas por los linfocitos NK, pero esto ocurre únicamente con células alogénicas, es decir; células de otro individuo (Moretta et al., 1996).

Para entender el por qué de los efectos inhibidores del MHC I en la actividad de los linfocitos NK, se ha propuesto la hipótesis de "un receptor inhibidor". Esta hipótesis propone que los linfocitos NK expresan en su membrana plasmática, receptores para moléculas de MHC clase I, que discriminan alelos de clase I, y que estos receptores capturan señales que inhiben a los mecanismos de lisis de los linfocitos NK (Raulet, 1999).

Como algunos de los ligandos para los receptores activadores de linfocitos NK son expresados por células sanas, la activación de linfocitos NK está bajo un estricto control negativo llevado a cabo por sus receptores inhibidores polimórficos, que reconocen a los distintos alelos MHC I y evitan la destrucción de células normales por linfocitos NK (Long and Wagtmann., 1997). Aunque los linfocitos NK expresan receptores para el MHC I propio y para MHC I ajenos, todos expresan al menos un receptor inhibidor del MHC I, expresado en las células propias (López-Botet and Bellón., 1999), asegurando de esta manera que puedan ser reconocidos y protegidos de la citolisis (Long and Wagtmann., 1997).

Un receptor inhibidor de NK de cualquier tipo no interactúa con todos los Ags (antígenos) MHC I, por lo que cada receptor generalmente identifica un grupo de antígenos MHC I que comparte una región antigénica (Seaman., 2000). Pertenecen a la familia del supergen tipo inmunoglobulina (tipo I) y de las lectinas tipo C (tipo II). Los más importantes conocidos hasta ahora son: receptores Ly49, **KIR**, CD94/NKG2 y KLRE1 los cuales después de la unión de su ligando, los "motifs" citoplasmáticos llamados "ITIM's" son fosforilados, resultando en el reclutamiento y activación de fosfatasas que afectan el señalamiento intracelular mediante la activación de sus receptores (Lanier., 2003).

6. RECEPTORES KIR.

A diferencia de los linfocitos T y B, las células NK no requieren el proceso de re-arreglo de genes para producir el repertorio de receptores de antígeno (Borregaard et al., 2000).

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

Estos receptores tienen una estructura diferente a la del complejo receptor de la célula T y se les denomina "receptores tipo inmunoglobulina" (KIR). Los KIR son glicoproteínas que funcionan como receptores del tipo inmunoglobulina. Pertenecen a un grupo de moléculas reguladoras encontradas en las células linfoides y juegan un papel crítico en el reconocimiento de las moléculas de MHC I propias para proteger a las células normales de la lisis por NK de un huésped invasor (Sun, 2003). Al igual que MHC I, los *KIR*s muestran un alto polimorfismo genético (Parham, 1997).

De acuerdo a su función estos receptores se dividen en:

- Activadores: encargados de llevar a cabo la actividad citotóxica.
- Inhibidores: encargados del reconocimiento de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I).

Los receptores KIR están codificados por una familia de 14 genes aproximadamente, provenientes de un polimorfismo poligénico y multi–alélico y agrupados en una región de 150 kb aproximadamente (Gomez-Lozano et al., 2002). Este *loci* se localiza en el cromosoma 19q13.4 dentro del sistema receptor leucocitario (LCR) 1 Mb (**Figura 4**).

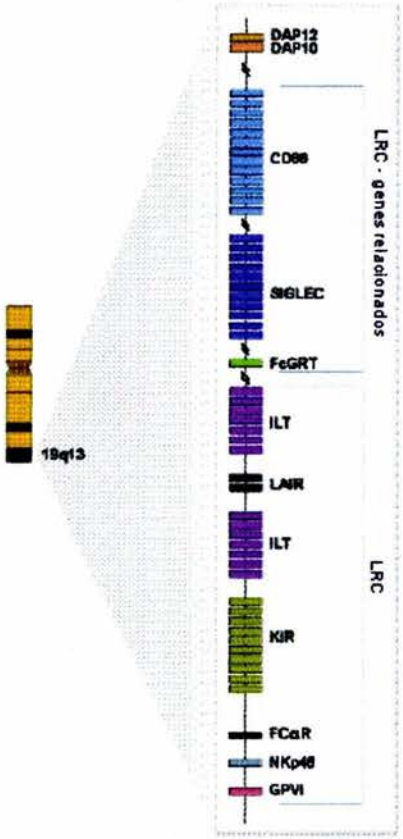


Figura 4. Mapa del sistema receptor leucocitario (LCR). Adaptado de Trowsdale (2001).

Los genes están organizados de una forma en que cada gen tiene una extensión aproximadamente de 10–16 kb con una secuencia que separa cada par de genes de alrededor de 2 kb, excepto para una extensión de 14 kb correspondiente a una secuencia única hacia arriba para el gen *2DL*4.

A. Nomenclatura KIR

Los receptores KIR tipo Ig son denominados con base al número de dominios: **2D** ó **3D** en la región extracelular (**Figura 5**) y en base a la longitud de la región citoplásmica: **S** ó **L** (*short* o corta y *large* o larga).

Un **dominio** es una región de secuencias de aminoácidos de una proteína a la que puede asignarse una función particular o su segmento correspondiente de un gen (Thompson et al., 1996).

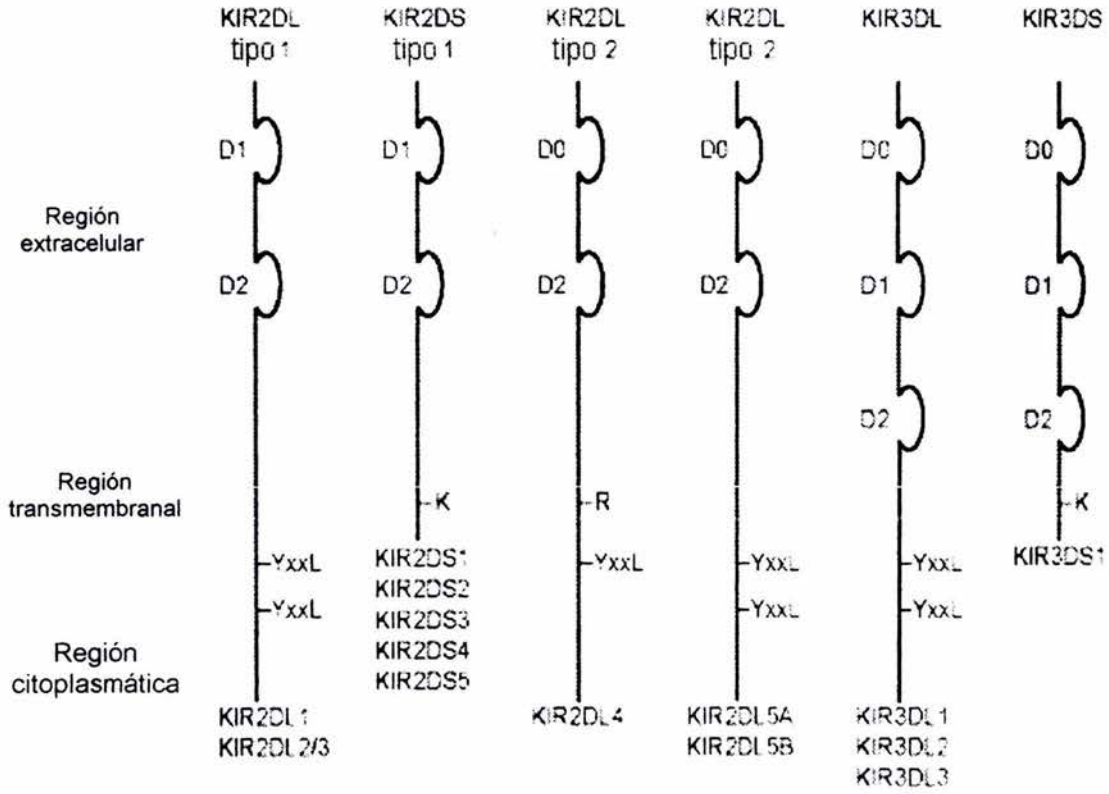


Figura 5. Estructura de los dominios de las moléculas tipo Ig KIR. Carrington (2003).

Es así como la nomenclatura de los genes *KIR* está estructurada por un número al final de 2D ó 3D, que distingue las diferentes clases de KIR con el mismo número de dominios extracelulares y tallo citoplasmático (*2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3*, etc). Se emplea un asterisco seguido de un conjunto de números para distinguir las variantes alélicas; tres dígitos se emplean para distinguir alelos, cuatro o cinco dígitos diferencian alelos sólo en una sustitución (ej; *2DL1*00301, 2DL1*00302*) (Shilling et al., 2001, Yawata et al., 2002).

A pesar de que se han identificado alrededor de 16 genes *KIR* (**Tabla 1**) para fines de este estudio, sólo se identificaron los genes y alelos más comunes reportados hasta la fecha en la literatura.

Los KIR con dominios largos citoplasmáticos (L) son inhibidores por tener sitios de inhibición basados en el inmunoreceptor a tirosina (ITIMs) presente en dichos dominios.

Los receptores activadores contienen residuos con carga en sus dominios transmembranales, que les permiten interactuar con moléculas de señalamiento intracelular, como son: FceRg, CD3z y DAP12 (Lanier et al., 1998). Es así como la región corta (S) KIR (dominios cortos citoplasmáticos) transmite activando señales a través de su interacción con una molécula adaptadora o de señalamiento intracelular denominada como DAP-12 (proteína activadora DNAX de 12kD; ésta molécula es también conocida como "*killer cell activating receptor-associated protein ó KARAP*"), la cual contiene sitios de activación basados en el inmunoreceptor a tirosina (ITAMs) (Lanier et al., 1998).

Tabla 1. Lista de genes *KIR* identificados hasta la fecha.

SIMBOLO	No. Alelos
KIR2DL1	10
KIR2DL2	5
KIR2DL3	10
KIR2DL4	18
KIR2DL5A	-
KIR2DL5B	-
KIR3DL1	22
KIR3DL2	20
KIR3DL3	7
KIR2DS1	4
KIR2DS2	8
KIR2DS3	3
KIR2DS4	9
KIR2DS5	3
KIR3DS1	6
KIR3DP1	4
KIR2DP1	?

Tabla elaborada a partir de datos de Carrington (2003).

B. Estructura Exón–Intrón de los genes *KIR*

Los **exones** representan la parte del gen que codifica la proteína durante la traducción. Es decir, la región de un gen que contiene la información para producir la proteína del gen. Los exones de un gen se separan por regiones largas de DNA llamadas **intrones** que no codifican ninguna proteína, pero que funcionan como sitios reguladores de genes (amplificadores o "enhancers", promotores, separadores o "insulators"; **Figura 6**). Un **seudogén** es un gen inactivo dentro de una familia génica, que está presente pero no se expresa y que se deriva por mutación de un gen activo ancestral (Thompson et al., 1996).

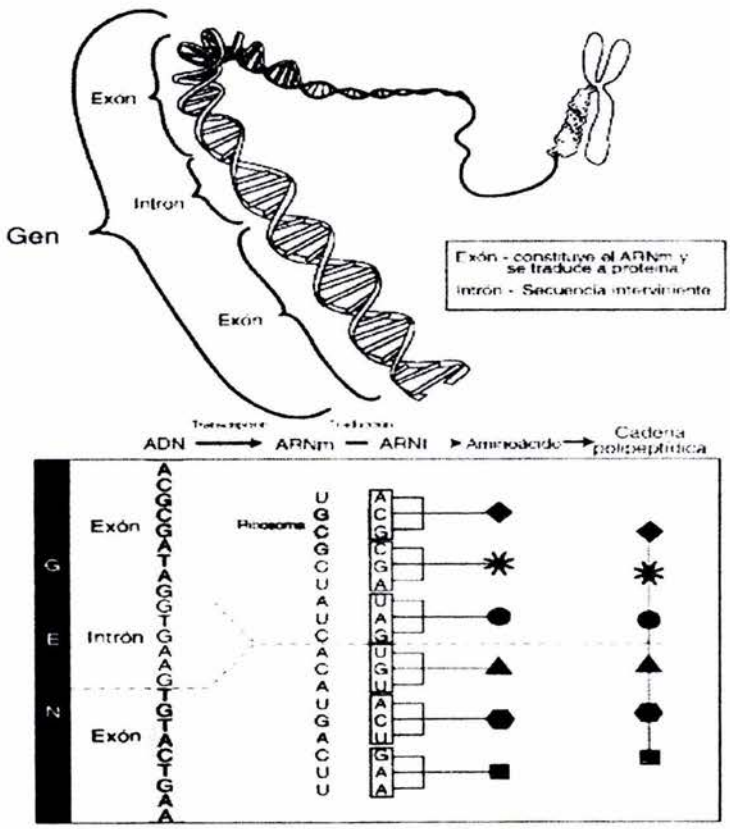


Figura 6. Constitución de un gen (estructura exón-intrón). Website:Genome.gov

La organización de la estructura exón–intrón de varios genes *KIR* es justamente consistente con el siguiente arreglo básico: la secuencia notable está localizada en los dos primeros exones y cada dominio Ig (D0, D1 y D2, comenzando de N-terminal) corresponde a los exones 3, 4 y 5, respectivamente. El eslabón y regiones transmembranales están cada una localizadas en los exones 6 y 7, y el dominio citoplasmático está localizado en los dos exones finales (8 y 9) (Wilson et al., 1997; **Figura 7**).

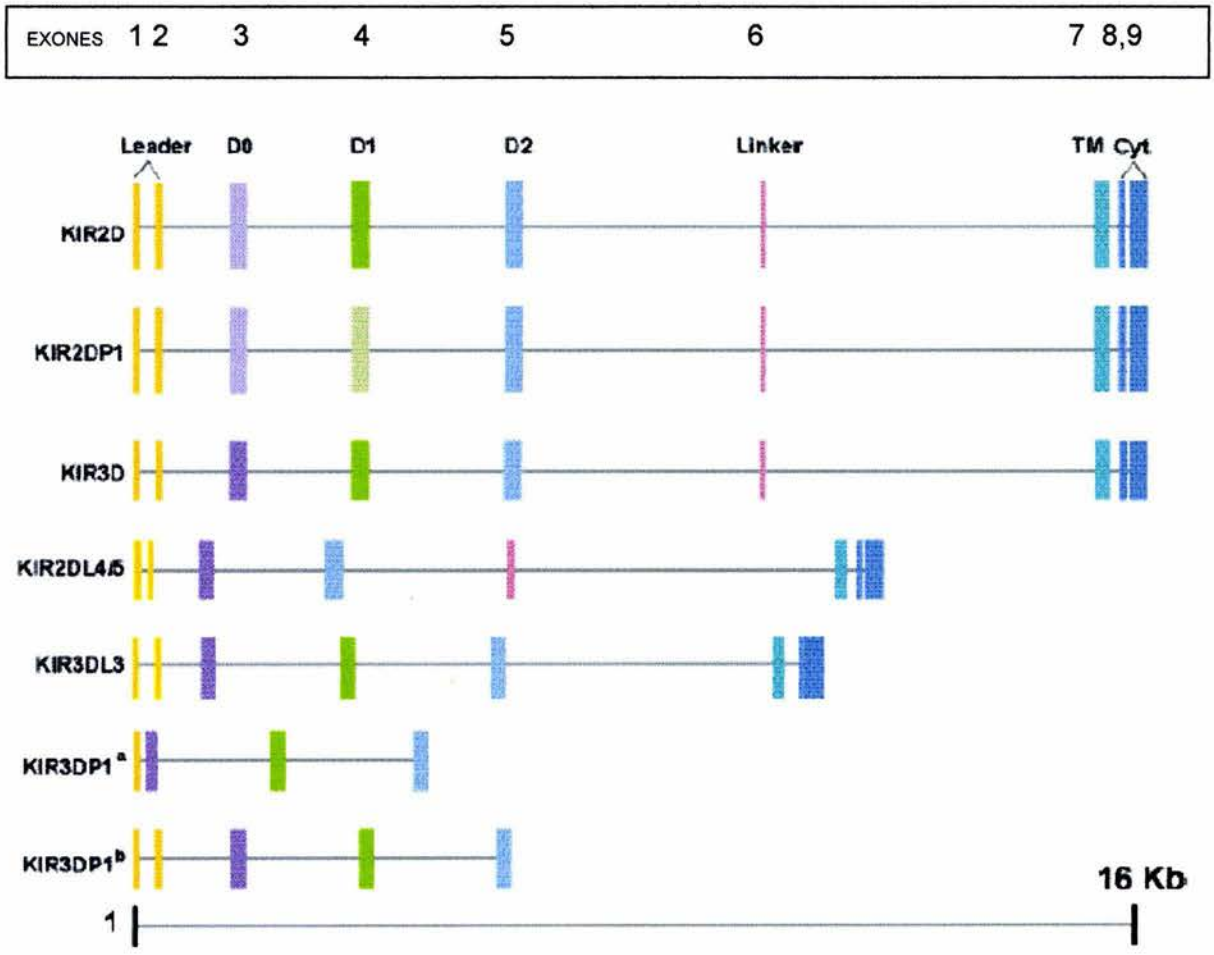


Figura 7. Estructura exón-intrón de los genes *KIR*. Los exones codifican los diferentes dominios de las moléculas KIR de la siguiente manera: Exón 1 y 2: Leader (amarillo); Exones 3, 4 y 5: dominios D0, D1 y D2, respectivamente (violeta, verde y azul); Exones 6 y 7: linker y regiones transmembranales, respectivamente (rosa y turquesa); Exones 8 y 9: dominios citoplasmáticos (azul fuerte). Tomado de Carrington (2003).

Los *KIR 2DL*1, *2DL2/3* y todos los genes *2DS* (conocidos como genes *KIR* tipo 1 de dos dominios) tienen una organización genética idéntica que codifica moléculas KIR con 3 dominios Ig. Sin embargo, el exón 3 es un seudoexón (exón que está presente pero no se expresa) en esos genes *KIR* de dos dominios, los cuales regularmente permanecen dentro del marco de lectura ("*in-frame*"), pero eventualmente el seudoexón 3 es empalmado, posiblemente debido a la eliminación de 3 pares de bases (Vilches y Parham, 2002). Por lo tanto, los productos proteicos KIR tipo 1 de dos dominios carecen del dominio (D0). Todas las células NK expresan al menos un KIR tipo 1, *2D* (Watzl et al., 2000).

El KIR tipo 2, de 2 dominios, el cual incluye *2DL4, 2DL5A y 2DL5B* (Vilches y Parham, 2002), se caracteriza por la ausencia completa del exón 4 (Selvakumar et al., 1997), y por lo tanto, sus productos proteicos no tienen el dominio D1. El gen *3DL3* reensambla cercanamente los genes de 3 dominios, pero el exón 6 está ausente.

Se han identificado dos pseudogenes *KIR (2DP* o *3D*P) (**Tabla 1**): *2DP*1, muestra una alta secuencia similar con genes *KIR* de dos dominios y posee dos seudoexones (3 y 4), y el segundo seudogene *3DP*1 remueve al exón 2 y es similar a *3DL3* en porciones del gen, pero tal vez representa un gen *KIR* ancestral (Carrington et al., 2003).

C. Variabilidad alélica de los genes KIR

La variación del complejo de genes *KIR* está en función tanto de polimorfismo alélico en una variedad de genes *KIR* como de una variabilidad en el número y tipos de genes presentes en una haplotipo dado (Selvakumar et al., 1997).

El análisis secuencial de cDNA de *KIR* ha mostrado que la mayoría de los genes *KIR* contienen sitios variables, y que algunos de ellos son bastante polimórficos (Gardiner et al., 2001).

Debido a un cruzamiento desigual de un lado a otro en el *locus*, se ha complicado la distinción entre alelos de un sitio particular y sitios genéticos separados.

Se sugiere que los genes *KIR2DS4* y *2DS1* son variantes alélicas de un sitio particular (Uhrberg et al., 1997), a pesar de que datos más recientes sugieren que representan sitios distintos (Norman et al., 2001). *3DL1* y *3DS1* ocupan la misma posición en diferentes haplotipos (Wilson et al., 2000) y el análisis segregatorio ha indicado que son verdaderamente alelos de un sitio particular (Gardiner et al., 2001). Se ha propuesto previamente que *3DS*1, el cual es sustancialmente menos frecuente que *3DL*1, apareció por un cruzamiento desigual de un lado a otro entre el gen ancestral *3DL1* y un gen ancestral activador *KIR* (Martin et al., 2002), basado en la alta similitud secuencial entre sus dominios extracelulares y la observación de que se segregan como alelos de un gen particular.

Los genes *KIR3DL1* y *3DL2* codifican moléculas que unen ciertos alotipos del HLA-B y HLA-A, ambos son bastante polimórficos y surgen para ser distintos a pesar de la fuente de la variabilidad entre los dos genes (Gardiner et al., 2001). Su recombinación genética es semejante que ha generado mucha diversidad en dichos genes (Shilling et al., 2002). Los alelos de *KIR3DL1* codifican moléculas que surgen para ser expresadas en diferentes niveles de la superficie de las células NK basado en anticuerpos de unión con los alotipos de *3DL1*.

Se han observado alotipos con alta, baja y nula unión y los niveles de expresión concuerdan con la variación de residuos de aminoácidos específicos de moléculas 3DL1 (Gardiner et al., 2001). Será interesante considerar las consecuencias funcionales de esas diferencias en la expresión de patrones.

7. GENOTIPIFICACIÓN *KIR.*

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

El método para la tipificación *KIR*, es la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos (PCR-SSP), descrito primeramente por Uhrberg y colaboradores (1997). Este método ha sido utilizado para registrar nuevos sitios descubiertos y alelos previamente no detectados (Cook et al., 2003). También se ha desarrollado otro método de PCR (sequence-specific oligonuleotide probe; PCR-SSOP) (Crum et al., 2000) y cerca de aproximadamente 100 diferentes perfiles de genotipos *KIR* han sido encontrados (Yawata, 2003).

Se han descrito reacciones (PCR-SSP; de medianas a altas resoluciones) de alelos específicos para *2DL*1, *2DL*3, *3DL1* y *3DL2* (Shilling et al., 2002) y se ha usado un ensayo (SSCP; single-stranded conformational polymorphism) para genotipificar el *KIR2DL4* (Witt et al., 2000).

8. KIR EN INMUNIDAD ADQUIRIDA.

Los receptores KIR pueden ser expresados por células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y parecen ser característicos de las células T de memoria $CD8^+$, por medio de las cuales, estos receptores pueden modificar la respuesta para un re-desafío antigénico (Mingari et al., 2000). La expresión de KIR parece ser inducible durante una rápida expansión clonal de células T (Snyder et al., 2002).

La inhibición de la actividad de la célula T por KIR puede asegurar que una respuesta secundaria sólo ocurra cuando el peligro es suficientemente fuerte. Por otra parte, la expresión del inhibidor KIR por células T durante una respuesta activa puede ayudar a las células T citotóxicas a permanecer enfocadas a células infectadas (Mingari et al., 2000). Las células T que adquieren receptores de activación NK pueden ser perjudiciales si no expresan el inhibidor *KIR* apropiado (Namekawa et al., 2000). Las células T que expresan aberrantemente el inhibidor *KIR*, no pueden eliminar efectivamente a las células infectadas (Mingari et al., 2000).

A. KIR y enfermedades

Solo un número limitado de estudios documentan asociaciones genéticas entre genes *KIR* y enfermedades específicas, principalmente debido a la reciente caracterización de sus genes y haplotipos. Las células NK han estado implicadas en la defensa contra enfermedades infecciosas, particularmente en infecciones virales, a través de mecanismos que participan en citotoxicidad y producción de citocinas (Biron et al., 1999), probablemente mediado en parte por moléculas estimuladoras KIR.

Los genes *KIR* inhibidores también podrían tener relevancia medica, por ejemplo: recientemente se ha reportado que se reducía el riesgo de recaídas en pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) que recibieron transplantes hematopoyéticos discordantes para los ligandos de KIR (esto es, discordantes en HLA) (Ruggeri et al., 2002).

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

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

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los receptores presentes en la membrana plasmática de las células NK codificados por un grupo de genes altamente polimórficos de tipo inmunoglobulina denominados como "*KIR*", no han sido estudiados hasta la fecha en poblaciones de México, mientras que en poblaciones de Asia, África, Australia, y en familias Caucásicas, (entre otras), se han identificado desde 7 hasta 14 genes y se ha detectado un número variable de estos genes en cada individuo. Considerando los grupos étnicos de México, que son poblaciones que viven en regiones agrestes (del campo), con cultura y civilización propia, resulta interesante iniciar este estudio con la posibilidad de encontrar diferencias en las frecuencias de estos genes.

2.1 Justificación

Los genes *KIR* juegan un papel importante en el control de la respuesta inmune, lo cual podría explicar algunas asociaciones observadas entre ciertos genes *KIR* y algunas patologías como: artritis reumatoide, artritis soriática, control de la progresión de la enfermedad por VIH, entre otras.

En poblaciones de México, la identificación de estos genes polimórficos *KIR* no ha sido realizada. Por lo cual, nuestro interés es comenzar a estudiar la variabilidad y presencia de dichos genes en algunas poblaciones indígenas de nuestro país. Y en un futuro relacionar estos datos con la susceptibilidad para el desarrollo de ciertas patologías.

3. HIPÓTESIS

Hipótesis:

El grupo de genes *KIR* es altamente polimórfico, por lo que es posible encontrar una variabilidad en la población indígena a estudiar (Purépechas y Nahuas).

Hipótesis nula:

Aunque el grupo de genes *KIR* es altamente polimórfico, NO se encontrará una variabilidad en la población indígena a estudiar (Purépechas y Nahuas).

4. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Identificar los genes del receptor tipo inmunoglobulina (*KIR*) de las células "Natural Killer" en dos grupos étnicos: Nahuas y Purépechas empleando el método de PCR-SSP.

2. Objetivos Particulares

Identificar en dos poblaciones indígenas mexicanas:

- ✓ La presencia de genes activadores (*KIRDS*).
- ✓ La presencia de genes inhibidores (*KIRDL*).
- ✓ Los alelos para los genes: *KIR2DL1*, *2DL3*, y *3DL1*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.

5.1.1 Muestra poblacional.

5.1.1.1 Selección de la muestra. La muestra de esta investigación está conformada por 55 individuos clínicamente sanos, no relacionados, correspondientes a dos poblaciones indígenas mexicanas.

5.1.1.2 Criterios para selección de muestra.

1. Padres y abuelos nacidos en la misma población.

2. No relacionados.

3. Consentimiento informado.

5.1.2 Fuente de casos. Los individuos objeto de este estudio, provinieron de dos grupos étnicos de dos distintas ciudades: Nahuas de Zitlala en Guerrero y Purépechas de San Andrés Tzirandaro en Michoacán (**Figura 1**). Estos grupos indígenas, también han sido estudiados en otras investigaciones (Peñaloza et al., 2001).

5.2 REACTIVOS.

5.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los reactivos usados para la PCR fueron: Taq polimerasa (5 U/μl), buffer (10x), $MgCl_2$ (50 mM), dNTP (12.5 mM) (Invitrogen, Brasil).

5.2.1.1 Iniciadores. Se utilizaron los iniciadores 5' sentido y antisentido (3 pM) y los iniciadores de MIC: 5' sentido CAG ACT TGC AGG TCA GGG GTC CCG (3 pM) y el 5' antisentido CAA TGA CTC TGA AGC ACC AGC ACT (45.8 nM) (Invitrogen, Brasil).

5.2.2 Electroforesis. Agarosa grado electroforesis (1.5 gr/100 ml), marcador comercial de pesos moleculares de 100 pb (Invitrogen, Brasil), buffer de boratos TBE (Trizma base 2 500 gr. PM 121.14, Ácido bórico 2.5 Kg. PM 61.83, EDTA 0.5 M, pH 8.0), bromuro de etidio 10 mg/ml. (Sigma Chemical, St.Louis, Mo.).

5.2.3 Equipo. Termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems), transiluminador (GELDOC 2000 BIO-RAD), espectrofotómetro (BECKMAN DU 650), cámara electroforética (BIO-RAD).

5.2.4 Controles. Como controles se incluyeron muestras de DNA de un estudio previamente realizado en el Anthony Notan Research Institute (Londres) donde se identificaron los genes *KIR* y alelos que buscamos, denominados como: C9, C12, C13, C18, C19, C20, 29ñ, 48ñ, 49ñ, 60ñ, 72ñ, 143ñ y 158ñ.

5.3 MÉTODOS.

5.3.1 Extracción de DNA. Se realizó la extracción de DNA total a partir de leucocitos de la sangre con el método de fenol cloroformo y precipitación con etanol. Estas muestras fueron proporcionadas a través de la colaboración con otro grupo de trabajo; Dra. Rosenda Peñaloza (UIMGH, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI) y Dra. Leonor Buentello (Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM). Finalmente el DNA se guardó a -20°C hasta el momento de su ensayo.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

A través de esta metodología se obtiene un número de copias elevado a partir de un segmento de ácido nucleico a estudiar. Utilizando este método es posible generar millones de copias de un segmento de DNA específico, las cuales se obtienen por medio de una repetición cíclica de tres etapas:

- Desnaturalización: este proceso se obtiene separando las cadenas de DNA con temperaturas elevadas, generando un molde de hebra simple.
- Alineamiento: en esta etapa ocurre una hibridación o unión de iniciadores a sus secuencias homólogas al DNA sustrato. Se unirán solamente a secuencias complementarias bajo condiciones específicas de temperatura.
- Polimerización o elongación: es la extensión en sentido 5' - 3' del complejo iniciador – sustrato. Esto se obtiene con la utilización de la enzima Taq polimerasa la cual va incorporando los nucleótidos (dNTPs).

Las cadenas recién formadas son separadas de nuevo por el calor y comienza otro nuevo ciclo de copias. Estos ciclos se repiten hasta que se obtiene el número de copias deseado. Cada ciclo dura aproximadamente 5 minutos y para conseguir una cantidad útil se requieren al menos 20 ciclos de reacciones.

5.3.2 Tipificación de la región *KIR* a través de la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específica (PCR-SSP). Se realizó la tipificación o identificación de 10 genes *KIR* (6 inhibidores y 4 activadores) con base en la metodología de iniciadores descritos por Uhrberg M, Gomez-Lozano N, Gardiner CM y col y Shilling HG; para detectar alelos específicos: 5 alelos para *KIR2DL1*, 3 para *KIR2DL3*, y 5 para *KIR3DL1*, así como la presencia o ausencia de *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR3DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* y *KIR3DS1*. Se utilizaron controles de DNA genómico pertenecientes a familias (padres e hijos) de un estudio previamente realizado (Anthony Notan Research Institute, Londres) para los genes *KIR* y alelos que buscamos. Para la validación de la metodología empleada se utilizó como control interno al exón 4 de MIC (gen constitutivo). La estandarización del método ya ha sido validada en el laboratorio en donde se realizó este estudio (Gutiérrez-Rodríguez comunicación personal 2004).

Amplificación con iniciadores de secuencia específica - PCR-SSP.

El método se basa en que un iniciador cuya secuencia es totalmente complementaria a la del DNA molde, se aprovecha más eficientemente en la reacción de amplificación del DNA que un "iniciador" que tenga una o varias bases desapareadas en un extremo 3'. Los iniciadores se diseñan y las condiciones se ajustan para que se amplifiquen con gran sensibilidad y especificidad a alelos o grupos de alelos. La asignación de las especificidades está basada en la presencia o ausencia del producto amplificado, el cual se visualiza en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta (Garavito, 2003).

5.3.3 Amplificación de DNA. Se empleó una mezcla con buffer (10x), $MgCl_2$ (50 mM), dNTPs (12.5 mM), primers (12.5 pM), MIC-exón 4 (3 pM), Taq polimerasa (5 U/μl) (Invitrogen, Brasil), DNA (25 ng/μl) y H_2O y se llevó a un termociclador con un volumen final de 12.5 μl. Las condiciones y temperaturas de amplificación para todas las reacciones tipificadas fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, luego 95°C por 20 segundos, 60-68°C durante 45-60 segundos y 70°C por 60 segundos durante 31 ciclos y finalmente la extensión de 7 minutos a 70°C.

5.3.4 Electroforesis en gel de Agarosa. Una vez realizada la amplificación, las bandas se identificaron en geles de agarosa al 1.5% a 150 volts por 30 min en 1x de TBE, visualizados con bromuro de etidio. Las muestras (8 μl) fueron cargadas con buffer de carga (3 μl) colocando un control de peso molecular (100 pares de bases ladder). Se estableció como amplificación negativa para *KIR*, cuando la banda de tamaño esperado estuvo ausente con presencia de la banda del control interno. El análisis y las asignaciones de cada uno de los alelos se dieron de acuerdo al tamaño en pb (pares de bases) de cada banda.

5.3.5 Análisis Estadístico. El análisis estadístico de cada antígeno en una población dada permite evaluar si hay diferencias entre las poblaciones estudiadas; para ello, calculamos el siguiente parámetro:

- Frecuencia Antigénica o Alélica (FA): es la proporción total de sujetos que son portadores de un antígeno determinado (alelo o gen para nuestro estudio). Se calcula en porcentajes. La estimación de este parámetro se hace contando el número de veces que un alelo dado aparece en una población, dividiendo por el número total de alelos encontrados en esa misma población y multiplicando por 100 (Garavito, 2003).

$$FA = \frac{a}{N} x100$$

FA = Frecuencia alélica.

a = Número de veces que aparece un determinado alelo en la población en estudio.
N = Número total de alelos presentados en la población en estudio.

- Chi cuadrada de Pearson corregida por Yates: la probabilidad se calculó considerando el número de genes estudiados.

$$1-(1-P)^n$$

P: probabilidad de yates

n: número de genes estudiados

5.3.6 Diagrama de flujo del diseño experimental.

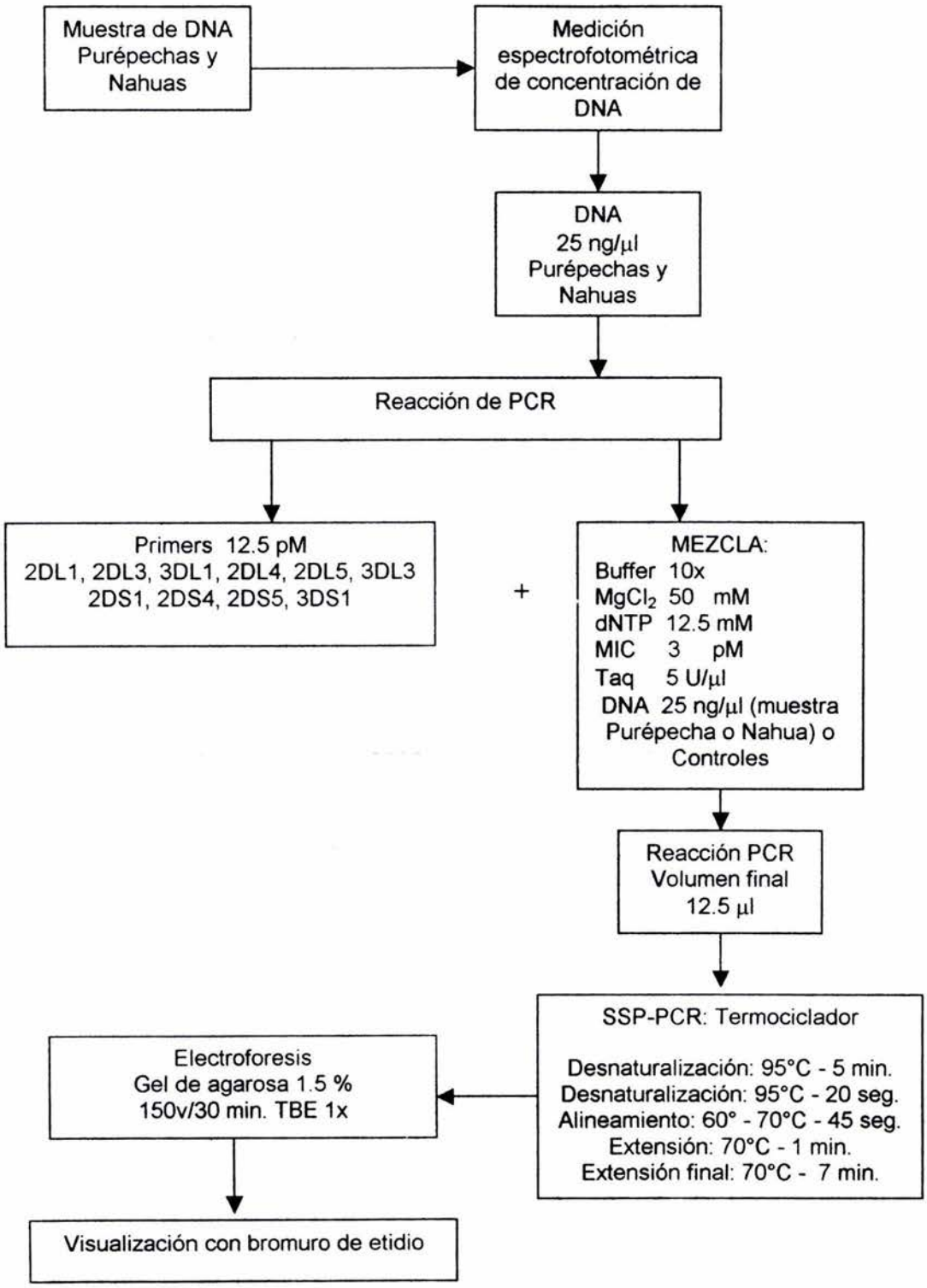


Diagrama de flujo elaborado a partir de datos de Palma (2004).

6. RESULTADOS

6.1 CONCENTRACIÓN DE DNA DE CADA GRUPO ÉTNICO ESTUDIADO.

Se midió la concentración de DNA y se hicieron las diluciones necesarias para obtener la concentración requerida en nuestro protocolo de 25 ng/μl (**Tabla 2 y 3**).

Tabla 2. Determinación espectrofotométrica de la concentración de DNA obtenido de sangre de Purépechas voluntarios sanos.

PURÉPECHAS			
Mtra	ABS 260	260/280	Conc ng/μl
1	0.027	1.9	67.72
2	0.027	1.8	66.35
4	0.030	2.1	75.08
5	0.033	1.9	81.71
10	0.032	1.9	78.91
16	0.032	2.2	81.35
17	0.030	1.9	74.94
18	0.029	2.0	72.61
19	0.031	2.0	76.69
21	0.033	1.9	82.18
22	0.027	1.9	66.64
23	0.028	2.1	71.04
24	0.034	1.9	85.86
26	0.028	1.9	69.96
27	0.021	2.3	52.09
28	0.019	1.9	46.38
29	0.022	1.8	55.70
31	0.026	2.0	66.05
32	0.029	1.8	73.74
33	0.031	1.9	76.80
34	0.032	2.1	79.10
35	0.020	1.9	48.95
36	0.014	2.0	36.03
38	0.008	4.2	19.52

n = 24

Lectura espectrofotométrica, OD_{260}/OD_{280} = 1.8 – 2.0 (Maniatis et al., 1989), n: tamaño de la muestra.

Tabla 3. Determinación espectrofotométrica de la concentración de DNA obtenido de sangre de Nahuas voluntarios sanos.

NAHUAS			
Mtra	**ABS 260**	**260/280**	**Conc ng/μL**
4	0.014	2.0	67.07
5	0.008	2.1	20.30
7	0.014	2.0	35.00
10	0.015	1.8	36.41
11	0.008	2.7	20.60
12	0.009	2.5	22.32
14	0.011	2.5	26.78
16	0.016	1.9	41.12
17	0.012	1.9	30.69
20	0.012	2.3	30.10
21	0.008	1.9	20.79
22	0.012	0.0	29.33
23	0.010	1.9	25.25
24	0.018	0.0	44.66
26	0.014	2.0	33.85
28	0.008	1.9	20.24
30	0.011	1.9	26.23
31	0.017	1.8	43.31
33	0.009	2.1	21.62
34	0.007	2.0	18.03
35	0.020	1.8	49.12
36	0.018	1.9	45.52
37	0.011	2.2	26.17
38	0.010	1.8	24.88
39	0.006	2.2	15.31
40	0.011	2.0	28.01
42	0.011	2.2	26.82
45	0.014	2.2	34.88
46	0.008	2.5	19.87
51	0.013	2.1	32.07
54	0.010	2.5	23.74

n = 31

Lectura espectrofotométrica, OD_{260}/OD_{280} = 1.8 – 2.0 (Maniatis et al., 1989), n: tamaño de la muestra.

Se identificaron 10 genes *KIR* en dos poblaciones indígenas mexicanas; 6 genes inhibidores (DL) y 4 genes activadores (DS). Se realizaron amplificaciones por la técnica de PCR-SSP de cada uno de los genes *KIR: 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL3, 2DS1, 2DS4, 2DS5* y *3DS1*, así como diferentes alelos para los genes inhibidores: *2DL1*, *2DL3* y *3DL1* (**Tabla 4**).

Tabla 4. Genes *KIR* identificados en la población indígena.

Genes *KIR* Inh/Act	No. alelos	Iniciadores 5' - 3'	Tamaño de amplificado (pb)
2DL1	*001,*002,*003,*004,*005 (5)	7	230 – 1750
2DL3	*001,*002/006,*004/005 (3)	7	700 – 1500
3DL1	*001,*002-003-006-007-008 *00401,*00402,*005 (5)	6	700 – 1700
2DL4	-	1	1000
2DL5	-	1	735
3DL3	-	1	270
2DS1	-	1	1800
2DS4	-	1	2000
2DS5	-	1	1950
3DS1	-	1	1728

Los primeros seis genes son Inhibidores (*DL*) y los últimos cuatro son activadores (*DS*). En negritas se muestran los genes en los cuales se identificaron alelos (*). Palma (2004).

6.2 AMPLIFICACIONES CON PCR – SSP.

6.2.1.1 La **Figura 8** muestra los amplificados de los controles que definen a 3 (*003, *004, *005) de los 5 diferentes alelos (*001, *002, *003, *004 y *005) que se han determinado para el gen *KIR2DL1*. Cada uno de ellos definido por los productos del siguiente grupo de iniciadores: A 1750 pb, B 260 pb, C 260 pb, D 2200 pb, E 2200 pb, F 230 pb y G 230 pb.

El alelo *003 se definió empleando los iniciadores C, E y F con un patrón de bandas de 260, 2200 y 230 pb, respectivamente.

El alelo *004 se definió empleando los iniciadores A, C, E y G con un patrón de bandas de 1750, 260, 2200 y 230 pb, respectivamente.

El alelo *005 se definió empleando los iniciadores C, E y G con un patrón de bandas de 260, 2200 y 230 pb, respectivamente.

CONTROLES 2DL1 [DNA= 25 ng/µl]

*001: B, E y G (260, 2200 y 230 pb)
*002: B, D y G (260, 2200 y 230 pb)
*003: C, E y F (260, 2200 y 230 pb)
*004: A, C, E y G (1750, 260, 2200 y 230 pb)
*005: C, E y G (260, 2200 y 230 pb)

Figura 8. Gel de agarosa (1.5 %) para controles (C9 y C19); asignación de alelos (*003, *004, *005) en el *KIR2DL1*. M.cas: marcador casero (hecho a partir de amplificados positivos de controles). Pb: pares de bases. La banda de 530 pb corresponde al control interno. Palma (2004).

6.2.1.2 En la **Figura 9** se muestran los amplificados correspondientes a la asignación de los diferentes alelos (*003 y *005) identificados en las muestras: 29, 31, 32 y 33 para el *KIR2DL1* en la población de Purépechas. Del mismo modo se realizó la asignación de alelos para el resto de la población.

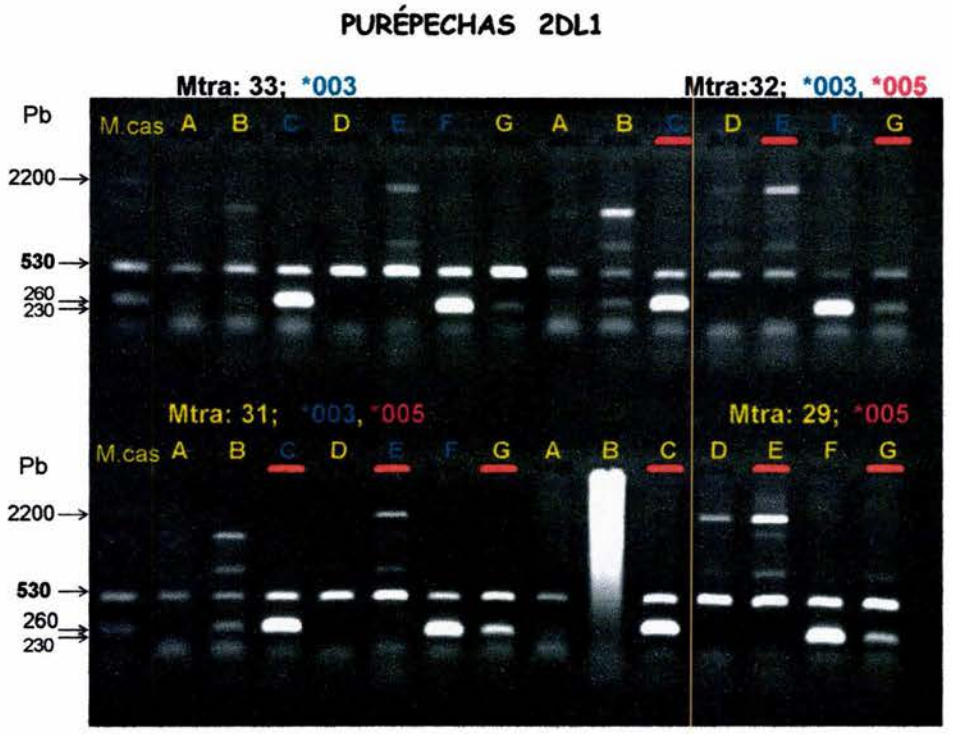


Figura 9. Gel de agarosa (1.5 %) para el grupo de Purépechas; asignación de alelos (*003 y *005) del *KIR2DL1*. Mtra: muestra. M.cas: marcador casero (hecho a partir de amplificados positivos de controles). Pb: pares de bases. La banda de 530 pb corresponde al control interno. Palma (2004).

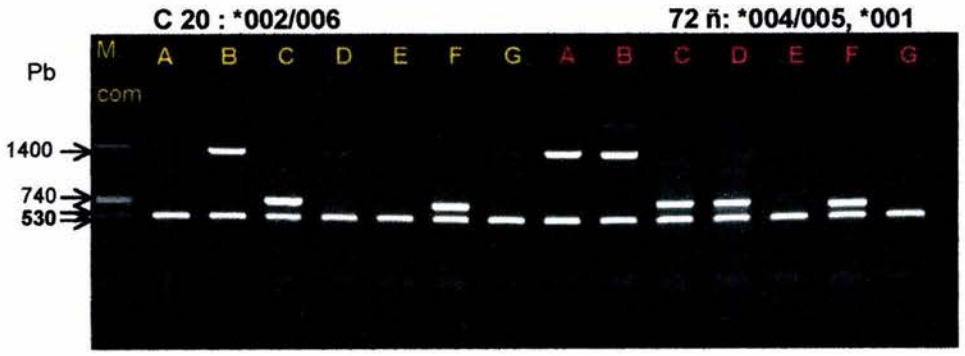
6.2.2.1 En la **Figura 10** se muestran los amplificados de los controles que definen a los 3 alelos (*001, *002/006, *004/005) para el gen *KIR2DL3*. Cada uno de ellos definido por los productos del siguiente grupo de iniciadores: A 1500 pb, B 1400 pb, C 740 pb, D 740 pb, E 700 pb, F 700 pb y G 1500 pb.

El alelo *001 se definió empleando los iniciadores B, D y F con un patrón de bandas de 1400, 740 y 700 pb, respectivamente.

El alelo *002/006 se definió empleando los iniciadores B, C, y F con un patrón de bandas de 1400, 740 y 700 pb, respectivamente.

El alelo *004/005 se definió empleando los iniciadores A, C y F con un patrón de bandas de 1500, 740 y 700 pb, respectivamente.

CONTROLES 2DL3 [DNA=25 ng/µl]



*001:	B, D y F (1400, 740 y 700 pb)
*002/006:	B, C y F (1400, 740 y 700 pb)
*004/005:	A, C y F (1500, 740 y 700 pb)

Figura 10. Gel de agarosa (1.5 %) para controles (C20 y 72ñ); asignación de alelos (*001, *002/006, *004/005) en el *KIR2DL3*. M.com: marcador comercial (100pb DNA ladder). Pb: pares de bases. La banda de 530 pb corresponde al control interno. Palma (2004).

6.2.2.2 La **Figura 11** muestra los alelos (*001 y *002/006) identificados en las muestras: 1, 2, 4 y 5 para el *KIR2DL3* en la población de Purépechas. Del mismo modo se realizó la asignación de alelos para el resto de la población.

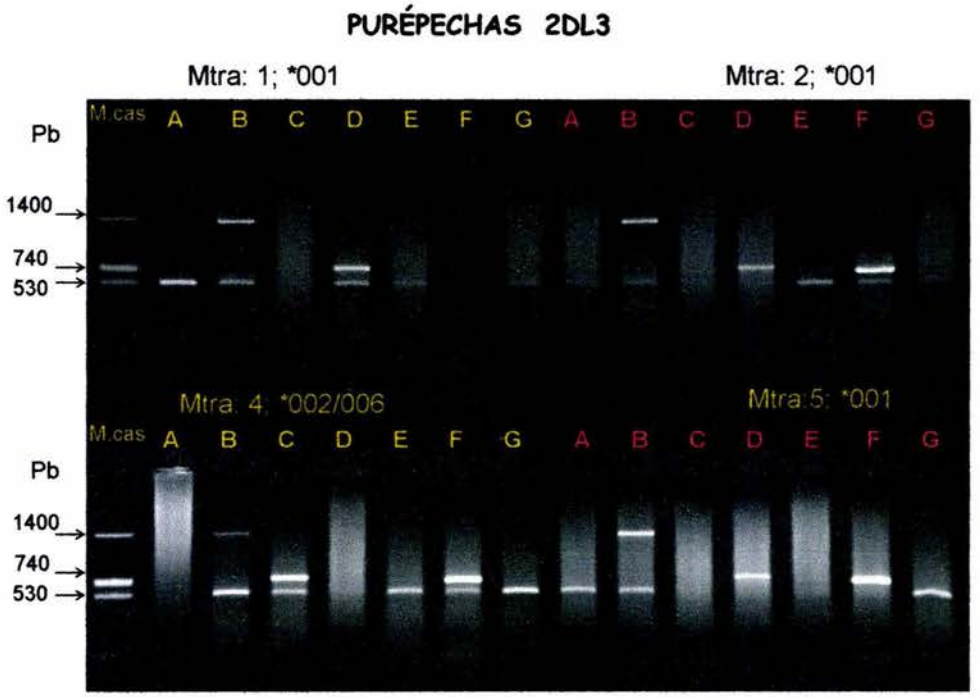


Figura 11. Gel de agarosa (1.5 %) para el grupo de Purépechas; asignación de alelos (*001 y *002/006) en el *KIR2DL3*. Mtra: muestra. M.cas: marcador casero (hecho a partir de amplificados positivos de controles). Pb: pares de bases. La banda de 530 pb corresponde al control interno. Palma (2004).

6.2.3.1 La **Figura 12** muestra los amplificados de los controles que definen a 3 (*002, *00401, *005) de los 5 diferentes alelos (*001, *002/008, *00401, *00402 y *005) que se han determinado para el gen *KIR3DL1*. Cada uno de ellos definido por los productos del siguiente grupo de iniciadores: A 1600 pb, B 1700 pb, C 800 pb, E 1600 pb, F 700 pb y G 700 pb.

El alelo *002/008 se definió empleando el iniciador B con una banda de 1700 pb.

El alelo *00401 se definió empleando los iniciadores C, y F con un patrón de bandas de 800 y 700 pb, respectivamente.

El alelo *005 se definió empleando el iniciador E con una banda de 1600 pb.

*001:	A (1600 pb)
*002-003-006-007-008:	B (1700 pb)
*00401:	C y F (800 y 700 pb)
*00402:	C y G (800 y 700 pb)
*005 :	E (1600 pb)

Figura 12. Gel de agarosa (1.5 %) para controles (60ñ y 158ñ); asignación de alelos (*002, *005, *00401) en el *KIR3DL1*. M.cas: marcador casero (hecho a partir de amplificados positivos de controles). Pb: pares de bases. La banda de 530 pb corresponde al control interno. Palma (2004).

6.2.3.2 En la **Figura 13** se muestran los alelos (*002/008 y *005) identificados en las muestras: 30, 31, 33, 34, 35 y 36 para el *KIR3DL1* en la población Nahua. Del mismo modo se realizó la asignación de alelos para el resto de la población.

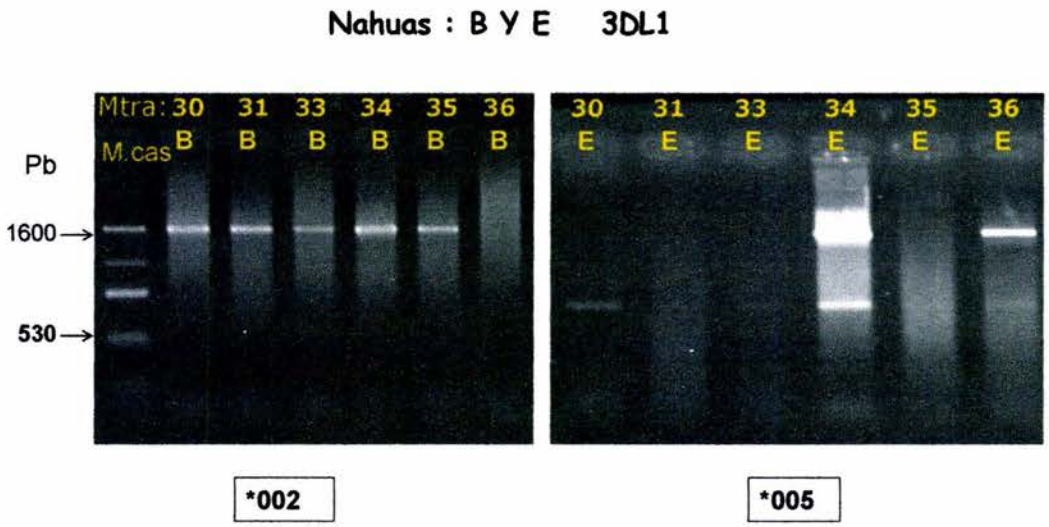


Figura 13. Gel de agarosa (1.5 %) para el grupo de Nahuas; asignación de alelos (*002 y *005) en el *KIR3DL1.* Mtra: muestra. M.cas: marcador casero (hecho a partir de amplificados positivos de controles). Pb: pares de bases. La banda de 530 pb corresponde al control interno. Palma (2004).

6.2.4 La **Figura 14** muestra un ejemplo en la identificación de la presencia o ausencia del gen *KIR2DS4*, tanto para controles (C20, 48ñ y 143ñ) como para algunas muestras (1, 20, 22, 33, 36 y 39). Sólo se muestra el ejemplo de una población, para indicar que así se realizó el método con la población restante, en los genes que poseen un solo par de iniciadores (*KIR2DL4, 2DL5, 3DL3, 2DS1, 2DS4, 2DS5 y 3DS1*).

PURÉPECHAS 2DS4

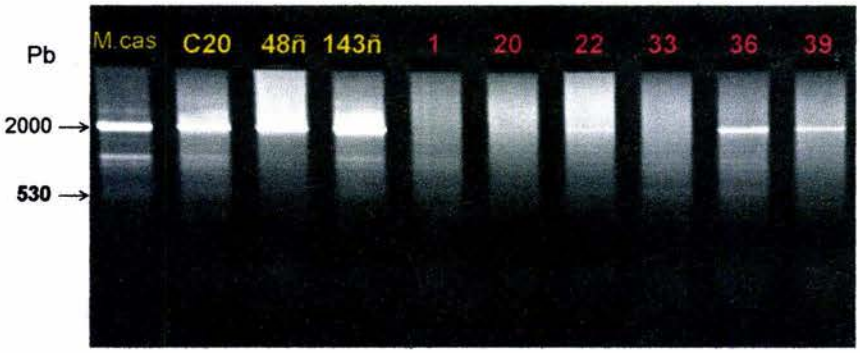


Figura 14. Gel de agarosa (1.5 %) para controles (C20, 48ñ y 143ñ) y muestras (1, 20, 22, 33, 36 y 39) en el grupo de Purépechas en el *KIR2DS4*. Identificación únicamente de la presencia o ausencia del gen. M.cas: marcador casero (hecho a partir de amplificados positivos de controles). Pb: pares de bases. La banda de 530 pb corresponde al control interno. Palma (2004).

6.3 IDENTIFICACIÓN DE GENES INHIBIDORES/ACTIVADORES Y ALELOS.

6.3.1.1 Identificación de genes inhibidores-activadores y alelos en la población Purépecha.

En la **Tabla 5** se muestran los genes inhibidores y activadores identificados en el grupo de Purépechas, así como también la identificación de alelos en los tres genes inhibidores *KIR2DL1, 2DL3* y *3DL1*. Para el resto de genes estudiados, sólo se detectó la presencia o ausencia del gen.

Tabla 5. Genes inhibidores, activadores y alelos identificados en la población Purépecha.

	INHIBIDORES						ACTIVADORES			
MUESTRA	2DL1	2DL3	3DL1	2DL4	2DL5	3DL3	2DS1	2DS4	2DS5	3DS1
1	*003	*001	*002/008, *005	+	+	+	-	-	+	+
2	*003	*001	*002/008, *005	+	-	+	-	+	-	-
4	*002	*002/006	*002/008	+	-	+	-	-	+	+
5	*003	*001	solo C	+	+	+	-	-	-	+
10	*003	*001	*005	-	-	+	-	-	-	-
16	*003	*001	*002/008	+	+	+	-	-	-	-
17	*003	*001	*002/008	+	+	-	-	-	-	-
18	*003	*001	*002/008	+	-	-	-	+	-	-
19	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	-	-	-
21	*003	*001	-	+	+	+	+	-	+	-
22	*003	solo F	-	+	+	+	-	-	-	-
23	*003	solo F	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
24	*003	*001	*002/008	-	+	+	+	+	+	+
26	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	-	-	+
27	*003	solo F	*005	+	-	-	-	-	-	-
28	*003	solo F	*002/008, *005	+	+	+	-	-	-	-
29	*003	*001	*002/008	-	-	+	-	+	-	-
31	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
32	*003	solo F	*002/008	+	-	+	-	-	-	-
33	*003	solo F	-	+	+	+	-	-	+	+
34	*003	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	*003	-	-	+	+	+	-	+	+	-
36	*003	solo F	*002/008	+	-	+	+	+	+	-
38	*003	solo F	*002/008	+	+	+	-	-	-	-
n = 24										
presencia de gen	24	22	19	20	12	20	3	8	7	6
alelos	24	14	21							

Tabla elaborada a partir de datos de Palma (2004), n: tamaño de la muestra.

6.3.1.2 Identificación de genes inhibidores-activadores y alelos en la población Nahua.

La **Tabla 6** muestra los genes inhibidores y activadores identificados en el grupo de Nahuas, así como también la identificación de alelos en los tres genes inhibidores *KIR2DL1, 2DL3* y *3DL1*, para el resto de genes estudiados, sólo se detectó la presencia o ausencia del gen.

Tabla 6. Genes inhibidores, activadores y alelos identificados en la población Nahua.

	INHIBIDORES						ACTIVADORES			
MUESTRA	2DL1	2DL3	3DL1	2DL4	2DL5	3DL3	2DS1	2DS4	2DS5	3DS1
4	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
5	*003	solo F	*002/008	-	-	+	-	-	-	-
7	*003	solo F	*002/008	-	-	+	-	+	-	-
10	*003	solo F	*002/008, *005	+	-	+	-	+	-	-
11	*003	*001	*002/008	+	-	-	-	-	-	-
12	*003, *002	-	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
14	*003	*002/006	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
16	*003	*001	*002/008	+	+	+	-	+	-	-
17	*003	*001	-	+	+	+	-	+	-	-
20	*003, *002	*001	*002/008, *005	-	-	+	-	+	-	-
21	*003, *002	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
22	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
23	*003, *002	*001	*002/008	+	-	-	-	-	-	-
24	*003	*001	*002/008	+	+	-	+	-	+	-
26	*003, *002	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
28	*003	solo F	*002/008	+	-	+	-	-	-	+
30	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
31	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
33	*003	solo F	*002/008	+	-	-	-	-	-	+
34	*003	*001	*002/008, *005	+	-	+	-	-	-	-
35	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	-	-	-
36	*003, *004	*001	*005	+	+	+	-	+	-	-
37	*003	solo F	-	+	+	+	-	-	-	-
38	*003	solo F	*002/008	+	-	-	-	-	-	-
39	*003, *002	solo F	*002/008	+	+	-	+	+	+	-
40	*003, *004	*001	*002/008	+	+	-	-	+	-	-
42	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	+
45	*003	solo F	*002/008	+	+	+	+	+	+	+
46	*003, *002	*001	*002/008	+	+	-	+	+	+	+
51	*003, *002	solo F	*005	+	+	-	-	-	-	-
54	*003	*001	*002/008	+	-	+	-	+	-	-
n = 31										
presencia de gen	31	30	29	28	10	22	4	20	4	5
alelos	41	21	32							

Tabla elaborada a partir de datos de Palma (2004), n: tamaño de la muestra.

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

6.4.1.1 Frecuencia de genes *KIR* en las poblaciones.

Frecuencias encontradas de los genes *KIR* (activadores e inhibidores) en la población estudiada (Purépechas y Nahuas) (**Figura 15**). Se identificaron 10 genes *KIR*, de los cuales el gen *KIR2DL1* fue el único que estuvo presente en toda la población indígena estudiada. Se encontró a los genes inhibidores (6 identificados) en una mayor frecuencia (75 – 100%, excepto el gen *2DL5* - 40% -) en comparación con los genes activadores (4 identificados) que se encontraron en una frecuencia más baja (10 – 20 %), con excepción del gen *2DS4* que se encontró en una frecuencia relativamente alta (50%) en toda la población estudiada.

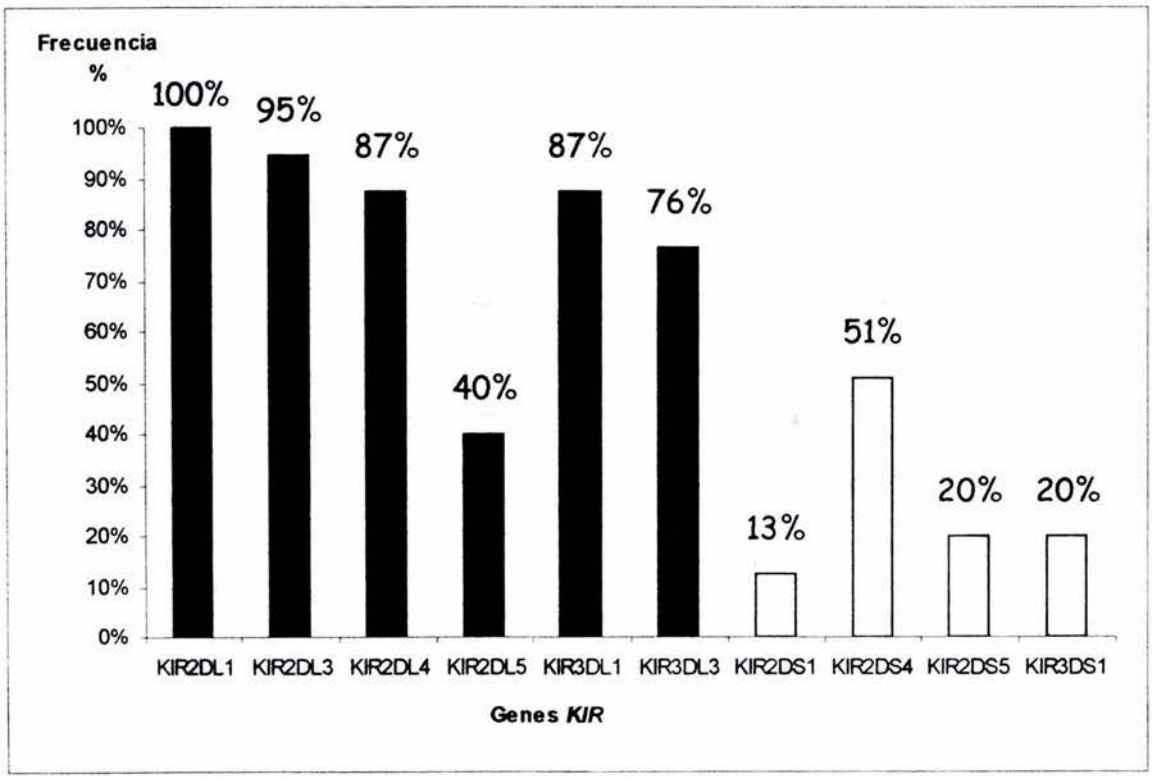


Figura 15. Frecuencias de genes activadores e inhibidores en la población indígena. DL: genes inhibidores. DS: genes activadores, n = 55, n: tamaño de la muestra. Gráfica elaborada a partir de datos de Palma (2004).

6.4.1.2 Frecuencia de genes inhibidores y activadores en cada población.

Frecuencias identificadas en cada uno de los genes, para cada una de las poblaciones estudiadas (**Figura 16**). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre ambos grupos étnicos.

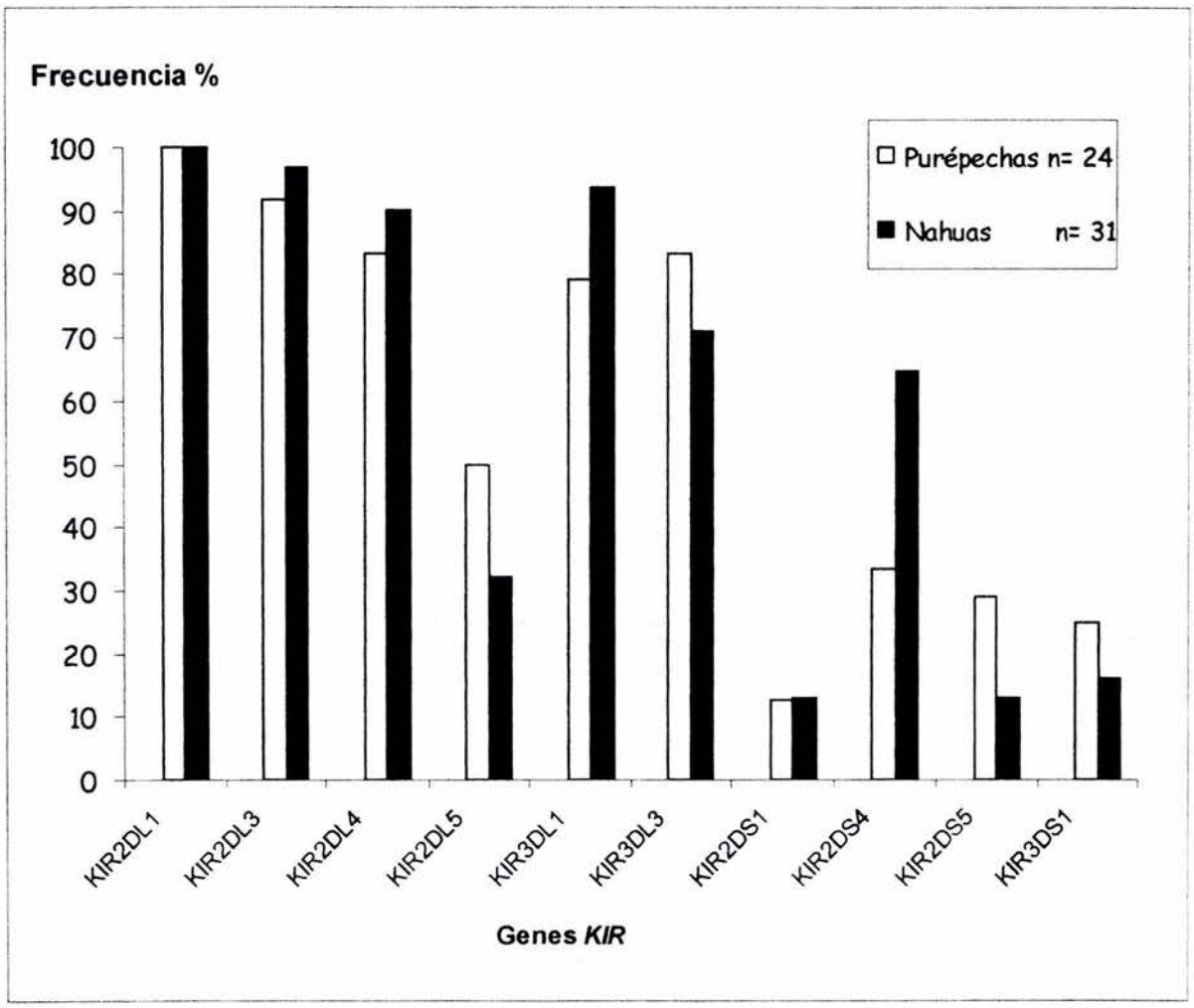


Figura 16. Comparación de genes activadores/inhibidores en Purépechas y Nahuas. DL: genes inhibidores. DS: genes activadores. Los datos son las frecuencias de genes activadores e inhibidores reportados en cada población estudiada (Purépechas y Nahuas).

6.4.1.2.1 Chi cuadrada de Pearson corregida por Yates (probabilidad "p") de genes inhibidores y activadores en cada población.

Los valores de "p" para todos los genes en la comparación entre las poblaciones Nahuas y Purépechas, fueron $p>0.05$ por lo que no se consideran significativamente diferentes.

6.4.2 Frecuencias alélicas de genes inhibidores en la población.

6.4.2.1 Frecuencia alélica del *KIR2DL1* en la población indígena.

Frecuencias alélicas (FA) identificadas en el gen *KIR2DL1* en las poblaciones de Purépechas y Nahuas (**Figura 17**).

De los 5 alelos que se determinaron (*001-*005) en este gen, sólo se identificaron 3 de ellos (*002, *003 y *004). **El alelo que más predominó fue el *003** (96% Purépechas y 76% Nahuas), mientras **que *002** estuvo en baja frecuencia tanto en Purépechas (4%) como en Nahuas (20%) **y *004** presente en Nahuas (5%) y ausente en Purépechas. El grupo Nahua presentó más diversidad de alelos; *002, *003 y *004 con respecto al grupo Purépecha que sólo presentó dos (*002 y *003).

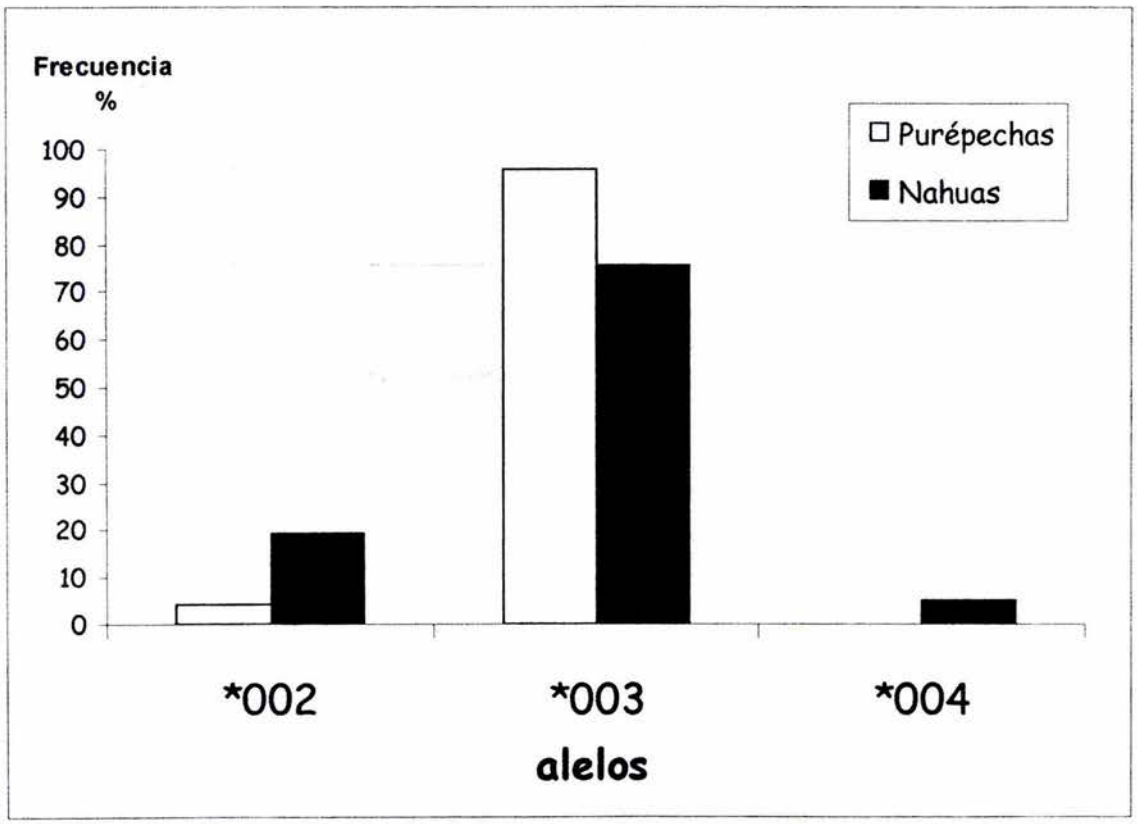


Figura 17. Comparación de la frecuencia alélica del gen *KIR2DL1*, * significa el alelo identificado. Gráfica elaborada a partir de datos de Palma (2004).

6.4.2.2 Frecuencia alélica del *KIR2DL3* en la población indígena.

Frecuencias alélicas (FA) identificadas en el gen *KIR2DL3* para cada población estudiada (**Figura 18**).

De los 3 alelos que se determinaron (*001, *002/006 y *004/005) para este gen, sólo se identificaron 2 de ellos (*001 y *002/006). El alelo más abundante y común en la población fue el ***001** (93 - 95%), mientras que el ***002/006** se encontró en una frecuencia muy baja en la población estudiada (5 - 7%).

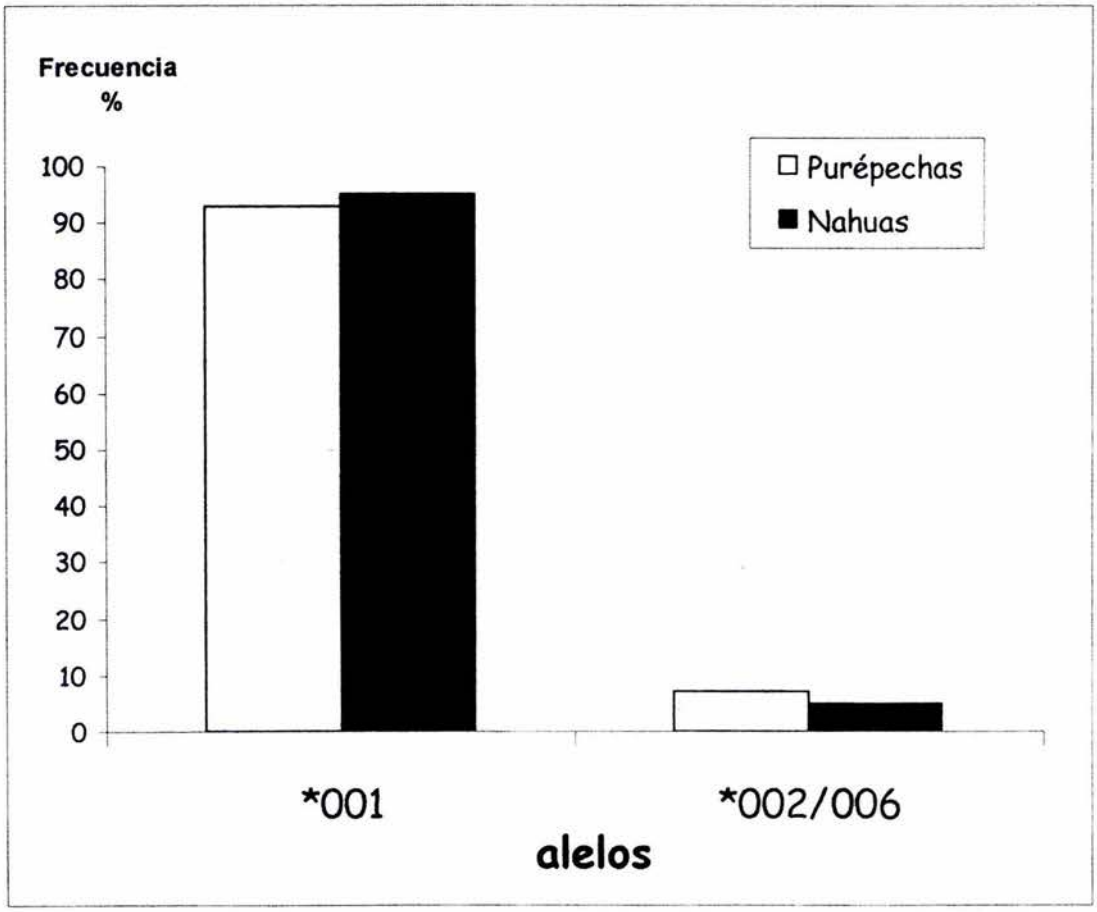


Figura 18. Comparación de la frecuencia alélica del gen *KIR2DL3*, * significa el alelo identificado. Gráfica elaborada a partir de datos de Palma (2004).

6.4.2.3 Frecuencia alélica del *KIR3DL1* en la población indígena.

Frecuencias alélicas (FA) encontradas en el gen *KIR3DL1* en cada población. (**Figura 19**).

Finalmente de los 5 alelos que se determinaron (*001, *002-003-006-007-008, *00104, *00402 y *005) en este gen, sólo se identificaron 2 de ellos (*002/008 y *005). El ***002/008** fue el alelo más frecuente en ambas poblaciones (80 -84%) en comparación con ***005** que se halló en una frecuencia baja en la población estudiada (16 – 20%).

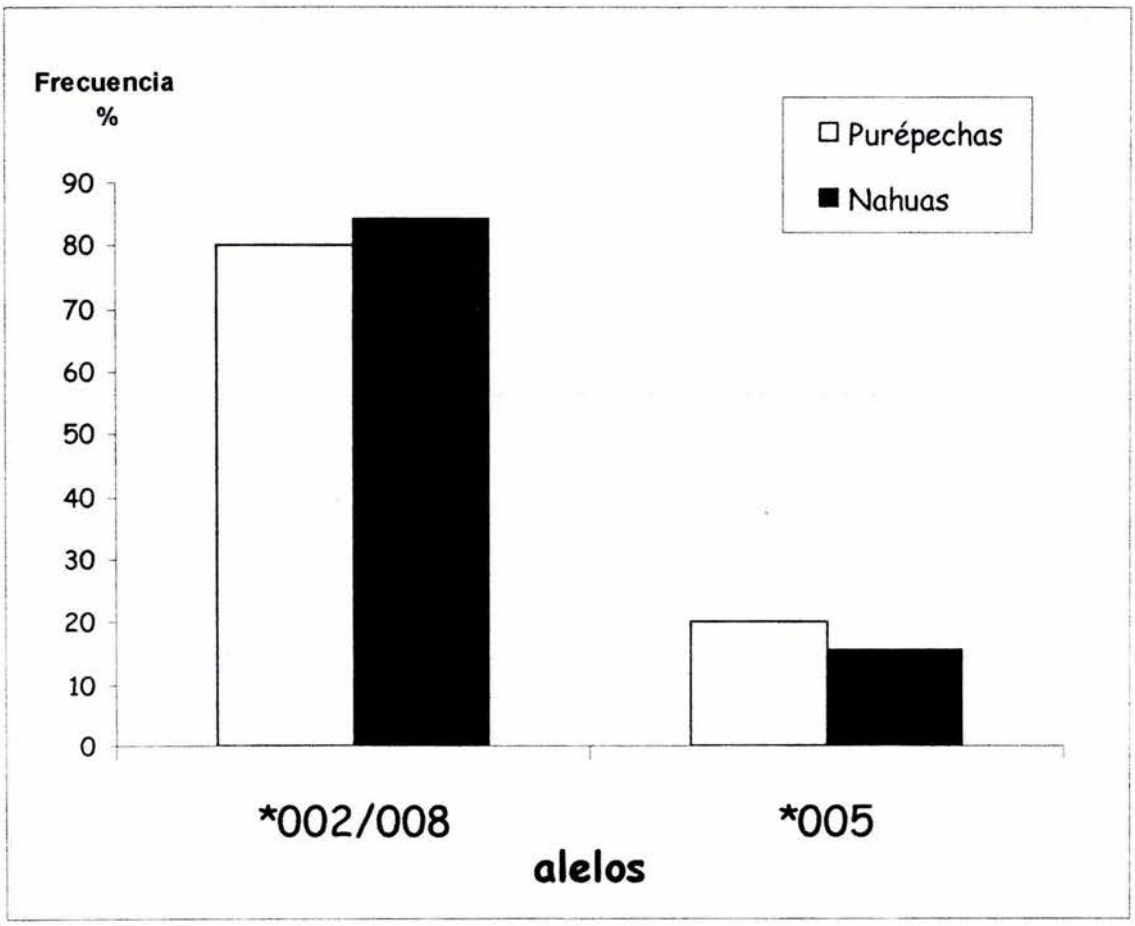


Figura 19. Comparación de la frecuencia alélica del gen *KIR3DL1,* * significa el alelo identificado. Gráfica elaborada a partir de datos de Palma (2004).

7. DISCUSIÓN

Se identificaron 10 genes *KIR*, encontrando que los genes inhibidores están en una mayor proporción en comparación con los genes activadores. Las frecuencias de la mayoría de los genes *KIR* observados en nuestra población caen dentro de los límites establecidos en estudios previos informados en la población Irlandesa (Crum et al., 2000), Caucásica, Vietnamita (Toneva et al., 2001), Griega (Dimitra et al., 2003), Palestina, Asiática (Norman et al., 2001), Africana (Norman et al., 2002) y Japonesa (Yawata et al., 2002), entre otras. En todas estas poblaciones también se ha encontrado una mayor frecuencia de genes inhibidores (>80%) con respecto a los genes activadores (<50%), con excepción de dos genes inhibidores *2DL5* y *3DL3* (que no son encontrados en la mayoría de las poblaciones). El caso contrario ocurre en la población Australiana donde las frecuencias de genes son mayores para los genes activadores (>80%) que para los inhibidores (excepto 2DL2 <80%).

Por otro lado, a pesar de tener el conocimiento de que el grupo de genes *KIR* es altamente polimórfico, en la comparación de frecuencias de los genes activadores e inhibidores entre las poblaciones indígenas estudiadas (Purépechas y Nahuas), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, esto es, que la p obtenida en la comparación entre los dos grupos para cada gen fue $p>0.05$. Sin embargo, en un estudio anterior (Peñaloza et al., 2001) realizado con las mismas muestras (y otras más) de las poblaciones indígenas estudiadas en esta investigación, se informa que no se ha presentado una mezcla genética entre Purépechas y Nahuas. Ambas investigaciones están enfocadas al estudio de polimorfismo pero con diferente abordaje y es por ello que pudiera presentarse esta aparente contradicción.

Asimismo, se realizó un análisis estadístico comparativo de las frecuencias de genes entre las poblaciones indígenas incluidas en este estudio (Purépechas y Nahuas) y

un grupo de Mestizos residentes en la Ciudad de México (Gutiérrez-Rodríguez comunicación personal 2004) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Comparación de frecuencias de genes *KIR* identificados entre Mestizos y Grupos étnicos estudiados.

	Purépechas %	Nahuas %	Mestizos %
KIR2DL1	100	100	100
KIR2DL3	92	97	100
KIR2DL4	83	90	100
KIR2DL5	50	32	49
KIR3DL1	79	94	99
KIR3DL3	83	71	100
KIR2DS1	13	13	42
KIR2DS4	33	65	98
KIR2DS5	29	13	40
KIR3DS1	25	16	42
n	**24**	**31**	**86**

%: frecuencia, n: tamaño de la muestra.

En la tabla anterior, se presentan las diferentes frecuencias observadas entre los tres grupos de comparación (Purépechas, Nahuas y Mestizos), sin embargo las diferencias estadísticamente significativas se encontraron entre: Purépechas y Nahuas con respecto al grupo de Mestizos para los genes *KIR3DL3* y *2DS4* ($p<0.05$). Para los genes *KIR2DL4 y 3DL1* el grupo de Purépechas mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de Mestizos ($p<0.05$).

Estos datos confirman que la población Mestiza es una población más abierta genéticamente hablando, esto significa que es una población con mayor mezcla genética en el transcurso del tiempo a diferencia de los grupos étnicos propios de una región.

Los genes inhibidores (DL) ***KIR2DL1*** **y** ***2DL3*** han estado presentes en casi todas las muestras (95 -100%) de Irlandeses, Caucásicos, Asiáticos, Japoneses y Mexicanos (Purépechas, Nahuas y Mestizos como grupo de comparación). El gen ***2DL5***, se encuentra en baja frecuencia (40 – 50%) en Africanos y Japoneses al igual que en Mexicanos. El ***KIR3DL3*** se muestra en alta frecuencia (>70%) en Griegos, Japoneses y Mexicanos. Con respecto a los genes activadores (DS), el gen ***2DS4*** también está en una frecuencia elevada (>85%) al igual que en población Mexicana (50%) en comparación con el resto de genes activadores. Por otra parte, otro gen activador ***2DS5*** estuvo ausente en Caucásicos, Australianos y Vietnamitas (Toneva et al., 2001), pero presente en baja frecuencia (< 40%) en Mexicanos, Irlandeses, Griegos, Africanos, Palestinos, Asiáticos y Japoneses, lo cual sugiere que es un receptor poco común (Norman et al., 2001; Uhrberg et al., 1997).

En este estudio se demuestra que la Población Mexicana posee características semejantes informadas en varias poblaciones del mundo (Irlandeses, Caucásicos, Vietnamitas, Griegos, Palestinos, Asiáticos, Africanos, Japoneses, etc). Sin embargo, las discrepancias observadas confirman el papel significativo de la distribución geográfica y la difusión de varios perfiles (cultura, civilización propia, etc).

Finalmente en lo que se refiere a los alelos, es importante resaltar que para el *KIR2DL3*, en algunas muestras de las dos poblaciones (18 muestras aproximadamente), se detectó únicamente la presencia del amplificado de un sólo iniciador correspondiente al denominado con la letra F.

De igual manera ocurrió con el gen *KIR3DL1* donde para el grupo Purépecha, se detectó únicamente en una muestra el amplificado correspondiente al iniciador denominado con la letra C (ver Tablas 6 y 7). Estos datos sugieren la presencia de nuevos alelos no informados hasta la fecha en la literatura y si fuera este el caso, sería una nueva aportación al repertorio polimórfico *KIR*.

Asimismo, para los genes que se determinaron alelos; *KIR2DL1, 2DL3* y *3DL1*, se realizó una comparación de frecuencias alélicas de los grupos étnicos estudiados y Mestizos (Gutiérrez-Rodríguez comunicación personal 2004). En el gen *KIR2DL1*, se observa una diferencia significativa para el alelo *002 entre Purépechas y Nahuas (4 y 20% respectivamente) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Frecuencia de alelos identificados en el *KIR2DL1* en tres poblaciones.

KIR2DL1			
Alelo	PUREPECHAS %	NAHUAS %	MESTIZOS %
*001	0	0	1
*002	4	20	18
*003	96	76	72
*004	0	5	9
n	**24**	**31**	**86**

%: frecuencia, n: tamaño de la muestra.

Para el gen *KIR2DL3*, no se observan diferencias significativas entre los tres grupos (Purépechas, Nahuas y Mestizos), considerando los diferentes tamaños de muestra de los tres grupos comparados (**Tabla 9**).

Tabla 9. Frecuencia de alelos identificados en el *KIR2DL3* en tres poblaciones.

KIR2DL3			
Alelo	PUREPECHAS %	NAHUAS %	MESTIZOS %
*001	93	95	79
*002/006	7	5	20
*004/005	0	0	1
n	**24**	**31**	**86**

%: frecuencia, n: tamaño de la muestra.

Finalmente, en el gen *KIR3DL1*, se observa una variabilidad alélica no significativa entre los grupos indígenas estudiados y el grupo de Mestizos, considerando los diferentes tamaños de muestra de los tres grupos comparados (**Tabla 10).**

Tabla 10. Frecuencia de alelos identificados en el *KIR3DL1* en tres poblaciones.

KIR3DL1			
Alelo	PUREPECHAS %	NAHUAS %	MESTIZOS %
*001	0	0	7
*002/008	80	84	68
*00401	0	0	2
*00402	0	0	5
*005	20	16	19
n	**24**	**31**	**86**

%: frecuencia, n: tamaño de la muestra.

Hay que destacar que en estas poblaciones -proporcionalmente reducidas- se presenta un amplio polimorfismo en los genes *KIR* estudiados. Lo anterior permite anticipar que el estudio de más poblaciones de nuestro país y probablemente un mayor tamaño de muestra, confirmarán la variabilidad del polimorfismo de los genes *KIR* señalando la importancia biológica del polimorfismo como tal.

Se necesitan otras investigaciones de diferentes poblaciones para el entendimiento completo de las implicaciones biológicas de la variedad de repertorios *KIR* presentes en los individuos. También la distribución étnica de diferentes perfiles *KIR* y su significado funcional. Considerando la falta de información acerca de los genes *KIR* en poblaciones de México, las frecuencias encontradas entre genes activadores, inhibidores y alelos entre una población y otra, hace interesante el presente estudio en nuestras poblaciones indígenas en relación a estudios informados en poblaciones del mundo entero. Con el polimorfismo existente, debido a la presencia o ausencia de genes y alelos de estos genes, se especula que en los siguientes años se podrán establecer posibles asociaciones de este polimorfismo con susceptibilidades autoinmunes, diversas infecciones, enfermedades malignas o resistencia a algunas enfermedades.

En resumen, los resultados de este estudio confirman que el grupo de genes *KIR* es polimórfico, ya que se encontró una variabilidad del repertorio de genes (inhibidores - activadores) y alelos en la población indígena estudiada.

8. CONCLUSIONES

- Las poblaciones aquí estudiadas presentaron un polimorfismo intrapoblacional de genes KIR debido a la variedad de genes y alelos identificados para cada gen.

- Los genes inhibidores *KIR* se identificaron con una mayor frecuencia respecto a los genes *KIR* activadores analizados en la población indígena.

- El gen inhibidor *KIR2DL5* se encontró en baja frecuencia en las dos poblaciones indígenas y el gen activador *KIR2DS4* presentó una frecuencia alta en los dos grupos étnicos.

- El gen *KIR2DL1* se identificó en las dos poblaciones indígenas con una frecuencia del 100%.

- Se encontraron frecuencias similares de genes *KIR* cuando se compararon con otras poblaciones (Irlandeses, Caucásicos, Vietnamitas, Griegos, Palestinos, Asiáticos, Africanos y Japoneses).

- Se encontró una mayor variedad de genes *KIR* y alelos en población Mestiza (como grupo de comparación) que en las poblaciones indígenas estudiadas.

9. REFERENCIAS

Abbas A. 1995. **Inmunología Celular y Molecular.** Segunda edición. Interamericana Mc. Graw Hill. España.

Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. 1999. **Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines.** ***Annu Rev Immunol. 17:189.***

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

Carrington M and P. Norman. 2003. **The KIR Gene Cluster.** Bethesda. MD: National Library of Medicine, National Center of Biotechnology Information. USA.

Cavalli – Sforza LL, Bodmer WF. 1971. **The genetics of human populations.** WH Freeman. San Francisco.

Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman, Allen R, O´Callaghan C.1998. **Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules.** ***J Immunol. 160: 3096-100.***

Cook M A., P. A. H. Moss, and D. C. Briggs. 2003. **The Distribution of 13 KIR loci in UK blood donors from 3 ethnic groups.** ***Eur J Immunogenet in Press.***

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

Chapel H. 1999. **Essentials of Clinical Immunology.** 4th edition. Blackwell Science. 1:22.

Farrera-Rozman. 1995. **Medicina Interna.** 13° edición.

Garavito de Egea G. 2003. **Asociación HLA y Artritis Reumatoide Juvenil.** Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

García-Miss, Patricia C, Cocom-Góngora, Mirza C, Mut-Martín. 2004. **Los receptores de los linfocitos de la inmunidad innata.** ***Biomed. 15:113-122.***

Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, Pando M, Carr WH, Rajalingam R, Vilches C, Parham P. 2001. **Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism.** ***J Immunol. 166:2992.***

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

Lanier L. 1998. **NK cell receptors.** ***Annu Rev Immunol. 16:359-93.***

Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips J. 1998. **Immunoreceptor DAP-12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells.** ***Nature.*** **391:703-7.**

Lanier LL. 2003. **Natural killer cell receptor signalling.** ***Curr Opin Immunol.*** **15:308-14.**

Lisker R. 1981. **Estructura Genética de la Población Mexicana.** Salvat Mexicana de Ediciones. México, D.F.1: 1-8.

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

López-Botet M, Bellón T.1999. **Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol.* 11:301-7.**
Mandelboim O, Malik P, Davis D, Jo C, Boyson J, Strominger J. 1999. **Human CD16 as lysis receptor mediating direc natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:5640-4.**

Maniatis, Fritsch, Sambrook. 1989. **Molecular cloning a Laboratory manual.** Second edition. Cold spring Harbor Laboratory Press. USA.

Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J. 2002. **Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet. 31:429.***

Mingari MC, Ponte M, Vitale C, Bellomo R, Moretta L. 2000. **Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function. *Hum Immunol. 61:44.***

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

Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, Goronzy JJ. 2000. **Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol. 165:1138.***

Niokou Dimitra, Spyropulou-Vlachou Maria, Darlamitsou Arete, Stavropoulos-Giokas Catherine. 2003. **Distribution of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors in the Greek Population. *Human Immunology. 64:1167-1176.***

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

Norman PJ, Carrington CV, Byng M, Maxwell LD, Curran MD, Stephens HA, Chandanayingyong D, Verity DH, Hameed K, Ramdath DD. 2002. **Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations.** ***Genes Immun. 3: 86-95.***

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

Peñaloza R, Delgado P, Arenas D, Barrientos C, Buentello L, Loeza F, Salamanca F. 2001. **(AC)n Dinucleotide Repeat Polymorphism in 5 B-Globin Gene in Native and Mestizo Mexican Populations.** ***Human Biology. 73:885-890.***

Raulet DH. 1999. **Developmente and tolerance of natural killer cells.** ***Curr Opin Immunol. 11:129-34.***

Robertis E. 1996. **Biología Celular y Molecular.** Duodécima edición. Editorial El Ateneo. Argentina.

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

Rojas-Espinosa O. 2001. **Inmunología (de memoria).** Segunda edición. Ed. Panamericana. México, D.F. 1:1-9.

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F. 2002. **Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants.** ***Science. 295:2097.***

Seaman W.E. 2000. **Natural killer and natural killer T cells.** ***Arthritis Rheum. 43:1204-17.***

Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. 1997. **Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors.** ***Immunol Rev. 155:183.***

Scheffler L. 1999. **Los indígenas mexicanos**. Panorama, octava reimpresión. 250pp.

Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D, Parham P. 2002. **Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype.** ***J Immunol. 168:2307.***

Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, Parham P. 2002. **Genetic control of human NK cell repertoire.** ***J Immunol. 169:239.***

Snyder MR, Muegge LO, Offord C, O'Fallon WM, Bajzer Z, Weyand CM, Goronzy JJ. 2002. **Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4+CD28null T cells.** ***J Immunol. 168:3839.***

Strickberger. 1988. **Genética.** Tercera edición. Ediciones Omega. Barcelona.

Sun P. 2003. **Structure and function of Natural-killer cell receptors.** ***Immunol Res. 27:539-48.***

Swadesh M.1959. **Indian linguistic groups of Mexico.** Escuela Nacional de Antropología e Historia. México, D.F.

Thompson M, McInnes R, Willard H. 1996. **Genética en Medicina.** Cuarta edición. Masson, S.A. Barcelona, España.

Toneva M, Lepage V, Lafay G, Dulphy N, Busson M, Lester S, Vu-Trien A, Michaylova A, Naumova E, McCluskey J. 2001. **Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations.** ***Tissue Antigens. 57:358.***

Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. 2001. **The genomic context of natural killer receptor extended gene families.** ***Immunol Rev. 181:20.***

Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P. 1997. **Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes.** ***Immunity. 7:753.***

Vilches C, Parham P. 2002. **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** ***Annu Rev Immunol. 20:217.***

Watzl C, Peterson M, Long EO. 2000. **Homogenous expression of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) on polyclonal natural killer cells detected by a monoclonal antibody to KIR2D.** ***Tissue Antigens. 56:240.***

Wilson MJ, Torkar M, Trowsdale J. 1997. **Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene.** ***Tissue Antigens. 49:574.***

Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, Trowsdale J. 2000. **Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families.** ***Proc Natl Acad Sci U S A. 97:4778.***

Witt CS, Martin A, Christiansen FT. 2000. **Detection of KIR2DL4 alleles by sequencing and SSCP reveals a common allele with a shortened cytoplasmic tail.** ***Tissue Antigens. 56:248.***

Yawata M, Yawata N, McQueen KL, Cheng NW, Guethlein LA, Rajalingam R, Shilling HG, Parham P. 2002. **Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression.** ***Immunogenetics. 54:543.***

Yawata M. 2003. **Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family.** ***Crit Rev Immunol. 22:463–482.***

Referencias World Wide Web (WWW)

COMISIÓN NACIONAL PARA EL DESARROLLO DE LOS PUEBLOS INDÍGENAS http://www.cdi.gob.mx/conadepi/index.php?option=articles&task=viewarticle&artid=419&Itemid=3. Ma. Cristina Saldaña Fernández, 2005.

http://www.cdi.gob.mx/conadepi/index.php?option=articles&task=viewarticle&artid=410&Itemid=3. Arturo Argueta, 2005

http://www.genome.gov/sglossary.cfm