



Universidad del Mar

Campus Puerto Escondido

Estudio de los polimorfismos de los genes del sistema principal de histocompatibilidad (HLA) clase I y II en indígenas mixtecos de la región Mixteca de la Costa de Oaxaca.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A
FILOGONIO CAÍN LÓPEZ PACHECO**

Director
Dr. David Cruz Robles

PUERTO ESCONDIDO, OAXACA, 2014.



UNIVERSIDAD DEL MAR

Puerto Escondido - Puerto Ángel - Huatulco

O A X A C A

Puerto Escondido, Oaxaca, 10 de octubre de 2014

ASUNTO: Votos aprobatorios

Dra. Irma Gisela Nieto Castañeda
Jefa de Carrera de la Licenciatura en Biología
Universidad del Mar, campus Puerto Escondido
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito “Estudio de los Polimorfismos de los Genes del Sistema Principal de Histocompatibilidad (HLA) Clase I y II en Indígenas Mixtecos de la Región Mixteca de la Costa de Oaxaca”, realizado por el pasante de la Licenciatura en Biología Filogonio Caín López Pacheco, con número de matrícula 05080021, quién cubrió los créditos de la Licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dr. David Cruz Robles

M. en C. Mónica Alicia Calderón Oropeza

Dr. Rolando Cardeña López

Dr. Noé Ruíz García

Dr. Serafín Jacobo López Garrido

c.c.p M. en C. Gerardo E. Leyte Morales. Vice-Rector Académico, Universidad del Mar
c.c.p. Ing. Ruth Cruz Ríos. Jefa del Departamento de Servicios Escolares, Universidad del Mar

Instituciones que financiaron este proyecto de investigación

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. El alumno contó con la beca del CONACyT con número de expediente 15079, 7464, otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores, con el visto bueno del Dr. Gilberto Vargas Alarcón.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a los diferentes grupos étnicos de todo el mundo, cuya diversidad genética y cultural pintan un abanico de colores que engalanan y embellecen la naturaleza; producto de miles y millones de años de evolución biológica y cultural.

A los pueblos autóctonos y a las minorías étnicas del mundo, que aún sobreviven en la actualidad a pesar de las adversidades. Y por qué no, a la memoria de los pueblos extintos, cuyo patrimonio genético, es un tesoro que se ha perdido por los desafíos que impone la vida.

A los grupos indígenas de América, por esa similitud genética que los caracteriza del resto de las poblaciones del globo. Dedicada especialmente a la cultura mixteca, porque su acervo genético, sus tradiciones, costumbres y variantes lingüísticas son tan valiosas como las del resto de las culturas existentes.

A mi mamá y a mi papá por enseñarme a no avergonzarme de mis raíces y origen étnico. A ellos por inculcarme el amor a la cultura mixteca y por transmitirme la lengua mixteca que es un tesoro prehispánico.

Finalmente, a la memoria de mi abuela materna Juana de la Paz Sarabia Bautista, descanse en paz.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron en la realización y culminación tanto de mi carrera universitaria como de mi tesis de licenciatura.

Me gustaría agradecer, en primera instancia, a mi papá y a mi mamá, por darme la oportunidad de formar parte de una maravillosa familia que ellos han forjado durante años. Muchas gracias por este grado que mi padre considera la mejor herencia. Muchas gracias a mi mamá por ser, para mí, la madre más cariñosa del mundo. Gracias por todo el apoyo económico y moral, los cuales sabré retribuir.

Agradezco enormemente a mis hermanos Aquilino, Javier y César por el gran soporte económico y moral brindado a lo largo de mi carrera. A mi hermano Juvenal por contagiarme su gran sentido del humor. A mi hermano Moisés por la orientación que me ha brindado en todo momento posible. Gracias a mi única hermana y a cada uno de los miembros de su familia (Ezequiel, Bertín, Aquilina y Évelyn); en especial a mi sobrina Ancelma por compartir conmigo momentos maravillosos. También a mi sobrino Brandon Manuel por el gran cariño que le tengo.

Muchas gracias a la Universidad del Mar por ser una excelente universidad con un estupendo modelo educativo. Gracias a todos sus profesores y aquellos de quienes recibí una enseñanza en el ámbito académico y ético. Mención especial merecen los profesores: Lic. Albert Coffee, Lic. Gabriela Ruelas, Dra. Rosalía Guerrero Arenas, Dr. Eduardo Jiménez Hidalgo y Dra. Mónica Galicia.

Gracias a todos aquellos y aquellas que fueron mis compañeros y compañeras de carrera, por los bonitos recuerdos que hoy perduran; en especial a Lucía Cabrera y Saira Lisbeth.

Gracias a Bernardo Borjas, Agustín y a mi amigo confidente Gerardo Calderón, por formar parte de mi círculo de amigos. También a mi amiga entrañable Bety y a Juan Villicaña con quien mantengo una excelente amistad. Muchas gracias al señor José Ramos y a su familia por esa época memorable como instructor del CONAFE.

No pueden pasar desapercibidos los agradecimientos al Dr. Epigmenio Rafael Reyes Cortés, al Dr. Miguel Ángel Mayoral Chávez y a la psicóloga Ita Bico Cruz López por ese verdadero apoyo moral que han sabido darme cuando más lo he necesitado. Sinceramente: ¡¡Muchas gracias!!

Agradezco infinitamente a las personas que donaron muestras de sangre periférica para la realización de mi proyecto de tesis y que sin duda alguna repercutirá en los estudios de genética poblacional. Gracias a las autoridades municipales del periodo 2011-2013 y de salud de las comunidades de San Juan Jicayán, San Pedro Jicayán, Pinoneta de Don Luis y San Agustín Chayuco. A los presidentes, regidores de salud, médicos y doctoras de las diferentes Unidades Médicas Rurales (UMR) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y promotoras del programa social Oportunidades de las comunidades ya mencionadas. Méritos especiales merecen, la doctora Marlene Canché de la UMR de San Pedro Jicayán y a las promotoras de Oportunidades de San Pedro Jicayán y San Juan Jicayán (Sra. Rosalía Morales Sánchez y maestra Felicitas Mateos Damián, respectivamente), por ese implacable entusiasmo y por esa iniciativa de colaboración incondicional.

Muchas gracias a mi médico y enfermero de confianza Iván García Meléndez por todo el apoyo incondicional y la asesoría que me brindó durante la toma de muestras de sangre y el traslado de las mismas.

Un enorme agradecimiento a las autoridades académicas de la Universidad del Mar por la confianza y el visto bueno que me otorgaron para la realización de este trabajo en las instalaciones de la misma universidad (extracción y procesamiento de ADN humano). Gracias al entonces Jefe de Carrera Dr. José Luis Villarruel Ordáz, a la encargada del laboratorio de genética la M. en C. Ana Claudia Sánchez Espinosa, al Dr. Serafín Jacobo López Garrido por estar siempre al tanto de mí durante las largas jornadas de trabajo de extracción de ADN. Agradezco enormemente al Jefe de Operaciones Miguel Ángel Barroso, de la aerolínea Interjet del Aeropuerto Internacional de Bahías de Huatulco por agilizar el traslado vía aérea de las muestras de ADN y plasma.

Gracias a los integrantes del laboratorio de genómica del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Gracias al Q.F.B. Silvestre Ramírez por ser mi instructor en el proceso de aprendizaje de extracción y cuantificación de ADN y verificación del mismo en geles de agarosa. A la M. en C. Nancy Martínez Rodríguez por enseñarme a secuenciar genes HLA. Al Dr. Gilberto Vargas Alarcón, muchas gracias, es un gran honor trabajar con él. Y por supuesto gracias a mi director de tesis, al Dr. David Cruz Robles por darme la oportunidad de trabajar con él.

Agradezco profundamente a la Dra. Clara Gorodezky, pionera en el campo de la inmunogenética en México, por su sensibilidad y generosidad para conmigo; de igual manera, a la Dra. Carmen Aláez por la atención que me ha brindado en el transcurso del desarrollo de mi tesis. Sinceramente, gracias a estas dos grandes figuras del trasplante de órganos y tejidos del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

También deseo expresar mi gratitud a mis revisores de tesis: al Dr. Rolando Cardeña López, Dr. Noé Ruiz García y M. en C. Mónica Alicia Calderón Oropeza, por las acertadas observaciones y comentarios; así como el tiempo tan valioso que han dedicado en la revisión o corrección de mi tesis.

Por último, gracias al Internado Sección “A” (ISA) del Pentatlón Deportivo Militarizado Universitario por darme la oportunidad de ingresar a sus filas y formar parte de la educación militar. A la población de reclutas, al cuerpo de cadetes y oficiales de cuartel y en general a mis subordinados por dejarse cuadrar bajo mi mando; y porqué no, a los pentathletas rebeldes que aún no han entendido el sentido del deber y disciplina militar. Gracias a mis superiores que conforman la actual administración; en particular, al señor director Tolentino José García por la oportunidad que me ha otorgado de trabajar, desarrollarme y crecer en el ámbito laboral y profesional; al médico Yoshimar Abel (subdirector) por el tacto con el que procede al tratar los asuntos administrativos; y al Control Militar Joaquín Jiménez Beltrán por ese estilo militar que lo caracteriza, del cual hay mucho que aprender. A mi estimado amigo José Andrés por su paciencia y comprensión. A mi querido amigo Emiliano Zapata por su maravillosa amistad. A mi paisano y camarada Laurencio Ortiz por su ayuda y generosidad,

los cuales me permitieron finalizar con éxito mi tesis. Al exdirector del ISA, el profesor Hugo Enrique Martínez Melgoza por recibirme por vez primera en esta institución y darme la bienvenida. ¡¡A todos ellos muchas gracias!!

Afectuosamente Filogonio Caín

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AELB	Algoritmo Excoffier-Laval-Balding.
DL	Desequilibrio de ligamiento.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg.
HLA	Antígenos de leucocitos humanos.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
SPH	Sistema principal de histocompatibilidad.
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
rpm	Revoluciones por minuto.
TA	Temperatura ambiente.
TE	Tris (hidroximetil) aminometano-hidrocloruro-EDTA.
UMR	Unidad Médica Rural.

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Estudios poblacionales, por grupos étnicos, con base en genes HLA (hasta agosto de 2014).....	26
Tabla 2. Genes HLA frecuentes en grupos étnicos nativos de Europa.....	29
Tabla 3. Genes HLA frecuentes en grupos étnicos nativos de Asia.....	29
Tabla 4. Haplotipos parciales y extendidos HLA presentes en palestinos y compartidos con otras poblaciones.....	32
Tabla 5. Genes HLA frecuentes en grupos étnicos nativos de África.....	33
Tabla 6. Genes HLA frecuentes en grupos étnicos nativos de Oceanía.....	34
Tabla 7. Genes HLA frecuentes en grupos étnicos nativos de América.....	36
Tabla 8. Grupos étnicos nativos de América del Norte estudiados con base en genes HLA.....	37
Tabla 9. Grupos étnicos nativos de América Central y del Sur estudiados con base en genes HLA.....	39
Tabla 10. Haplotipos HLA extendidos A-B-DRB1-DQB1 en amerindios.....	40
Tabla 11. Enfermedades autoinmunes asociadas a los genes HLA.....	42
Tabla 12. Frecuencia de los alelos de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i> en mixtecos de la Costa de Oaxaca.....	70
Tabla 13. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	71
Tabla 14. Subtipos HLA-A encontrados en mixtecos de la Costa y su distribución en grupos étnicos.....	72
Tabla 15. Subtipos HLA-B presentes en mixtecos de la Costa y su distribución en los	

	grupos étnicos.....	74
Tabla 16.	Subtipos HLA-DRB1 presentes en mixtecos de la Costa y su distribución en los grupos étnicos.....	76
Tabla 17.	Frecuencia de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i> en mixtecos por región geográfica.....	78
Tabla 18.	Frecuencias haplotípicas HLA-A-B y desequilibrio de ligamiento.....	80
Tabla 19.	Frecuencias haplotípicas HLA-A-DRB1 y desequilibrio de ligamiento.....	81
Tabla 20.	Frecuencias haplotípicas HLA-B-DRB1 y desequilibrio de ligamiento.....	82
Tabla 21.	Frecuencia haplotípica HLA-A-B-DRB1.....	84

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Mapa etnográfico de localización de la Nación Mixteca y grupos étnicos del estado de Oaxaca, México.....	5
Figura 2. Alelo específico del locus HLA-A y su nomenclatura.....	18
Figura 3. Localización y organización del complejo HLA clase I, II y III en el cromosoma 6.....	21
Figura 4. Localización y relaciones genéticas de distintas poblaciones humanas en el mundo.....	25
Figura 5. Número de trasplantes realizados y número de personas en lista de espera, en la República Mexicana.....	45
Figura 6. Localización de las comunidades muestreadas del presente estudio.....	55
Figura 7. Integridad de ADN genómico.....	66
Figura 8. Amplicones de diferentes exones de genes HLA.....	67
Figura 9. Electroferogramas de la secuencia parcial de ADN de genes HLA.....	69
Figura 10. Distribución de las frecuencias del subtipo HLA-A*68:03 en grupos étnicos nativos de los continentes.....	88
Figura 11. Distribución de las frecuencias del subtipo HLA-A*02:01 en grupos étnicos nativos de los continentes.....	92
Figura 12. Distribución de las frecuencias del subtipo B*51:01 en grupos étnicos nativos de los continentes.....	92
Figura 13. Distribución de las frecuencias del subtipo HLA-DRB1*08:02 en grupos étnicos nativos de los continentes.....	93

Índice

	Página
Dedicatoria	IV
Agradecimientos.....	V
Abreviaturas	IX
Lista de Tablas	X
Lista de Figuras	XII
Resumen	XVII
I. Introducción.....	1
I.1. Grupos étnicos: breve aproximación a sus denominaciones y estructura geográfica.....	1
I.2. Mesoamérica: la diversidad étnica de Oaxaca	3
I.3. La Nación Mixteca o Ñuu Savi (Pueblo de la Lluvia).....	5
I.3.1. Demarcación de las regiones de la Mixteca.....	6
I.3.2. La lengua mixteca.....	8
I.4. Diversidad genética humana: factores de variación y evolución.....	8
I.4.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	9
I.4.2. Fuentes de variación genética.....	10
I.4.2.1. Mutación.....	10
I.4.2.2. Recombinación genética.....	11
I.4.2.3. Migración y flujo génico.....	13
I.4.3 Fuerzas evolutivas.....	13
I.4.3.1. Selección natural.....	14
I.4.3.2. Deriva génica.....	15
II. Antecedentes.....	17
II.1. Generalidades del sistema principal de histocompatibilidad: sistema HLA.....	17
II.1.1. Función del sistema HLA.....	17
II.1.2. Nomenclatura de los genes del sistema HLA.....	18
II.1.3. Genética del sistema HLA.....	20
II.1.3.1. Estructura y polimorfismos de los genes del sistema HLA.....	20
II.1.3.2. Herencia y desequilibrio de ligamiento de los genes del sistema HLA.....	22

II.2. De los polimorfismos clásicos a los moleculares en los estudios de genética de poblaciones humanas.....	23
II.3. Panorama general de los grupos étnicos estudiados con base en genes HLA.....	25
II.3.1. Grupos étnicos originarios de Europa.....	27
II.3.2. Grupos étnicos originarios de Asia.....	29
II.3.3. Grupos étnicos originarios de África.....	32
II.3.4. Grupos étnicos originarios de Oceanía.....	34
II.3.5. Grupos étnicos originarios de América.....	35
II.3.5.1. Grupos étnicos originarios de América del Norte.....	36
II.3.5.2. Grupos étnicos originarios de América Central y del Sur.....	38
II.4. Aspectos relevantes de la asociación HLA-enfermedad.....	41
II.5. Los trasplantes de órganos y tejidos en el México actual.....	43
III. Justificación.....	47
IV. Objetivos.....	49
IV.1. Objetivo general.....	49
IV.2. Objetivos particulares.....	49
V. Hipótesis.....	50
VI. Aspectos éticos.....	51
VII. Material y métodos.....	52
VII.1. Criterios considerados durante la elección de los individuos estudiados.....	52
VII.1.1. Criterios de inclusión.....	52
VII.1.2. Criterios de exclusión.....	54
VII.2. Área de estudio.....	54
VII.3. Toma de muestras.....	55
VII.4. Extracción de ADN genómico.....	56
VII.4.1. Cuantificación y pureza de ADN genómico.....	57
VII.4.2. Integridad de ADN genómico.....	58
VII.4.3. Preparación de alícuotas de ADN.....	58
VII.5. Tipificación de genes HLA mediante secuenciación por el método de Sanger.....	58
VII.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa para los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i>	58
VII.5.2. Purificación de los productos de PCR.....	59

VII.5.3. Dilución de los productos de PCR.	60
VII.5.4. Reacciones de secuenciación para los productos de PCR.....	60
VII.5.5. Purificación con etanol de los productos de las reacciones de secuenciación.....	61
VII.5.6. Electroforesis capilar para los productos de las reacciones de secuenciación.....	62
VII.5.7. Obtención de secuencias.	62
VII.5.8. Interpretación y análisis de las secuencias.	62
VII.6. Análisis estadístico.	63
VII.7. Herramientas auxiliares.	64
VIII. Resultados	66
VIII.1. Integridad de ADN genómico.	66
VIII.2. Electroforesis de los amplicones de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i>	67
VIII.3. Secuencias obtenidas de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i>	68
VIII.4. Frecuencia de los alelos de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i>	69
VIII.5. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i>	71
VIII.6. Genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i> en mixtecos de la Costa: origen étnico y distribución a través de los grupos étnicos.....	71
VIII.6.1. Genes <i>HLA-A</i>	72
VIII.6.2. Genes <i>HLA-B</i>	73
VIII.6.3. Genes <i>HLA-DRB1</i>	75
VIII.7. Estructura genética de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i> en mixtecos de la Mixteca de la Costa y Mixteca Alta.	77
VIII.8. Frecuencias haplotípicas y desequilibrio de ligamiento de los alelos de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i> en mixtecos de la Costa.	80
IX. Discusión.....	86
IX.1. Genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i> en mixtecos de la Costa: origen étnico.....	86
IX.2. Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en el locus <i>HLA-B</i>	87
IX.3. Probable adaptación a las infecciones por patógenos.....	87
IX.3.1. Evolución del locus <i>HLA-A</i> en mixtecos de la Costa de Oaxaca.	88
IX.3.2. Evolución del locus <i>HLA-B</i> en mixtecos de la Costa de Oaxaca.	89
IX.4. Evidencias de variación genética intra e interétnica en función de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> y <i>-DRB1</i>	91
IX.5. Genes <i>HLA</i> , enfermedades y trasplantes de órganos o tejidos en mixtecos.	94

IX.6. Haplotipos HLA y desequilibrio de ligamiento.	96
X. Conclusiones	99
XI. Referencias	101
XII. Anexos	124
XII.Anexo 1. Carta de consentimiento informado.....	124

Resumen

El sistema de antígenos de leucocitos humanos (del inglés, HLA), codificado por los genes HLA, está implicado en el control de la respuesta inmune hacia agentes patógenos, aceptación o rechazo de trasplantes de órganos o tejidos y susceptibilidad o resistencia a enfermedades. La gran variabilidad de los genes HLA se ha utilizado en el conocimiento del origen y migración de las poblaciones humanas.

A fin de estimar la variación inter e intraétnica, se analizaron y contrastaron las frecuencias alélicas y haplotípicas (FAH) de los genes HLA en mixtecos con aquellas determinadas en grupos étnicos nativos de América, Europa, Asia, África y Oceanía.

Se extrajo ADN genómico partiendo de sangre periférica de 96 individuos mixtecos no emparentados y originarios de la Mixteca de la Costa de Oaxaca. Se secuenciaron, por electroforesis capilar, fragmentos de ADN marcados con terminadores fluorescentes y generados a partir de amplicones de los genes *HLA-A* y *-B* (exones 2, 3 y 4) y *HLA-DRB1* (exón 2). Se utilizó el software arlequín para determinar las FAH y el desequilibrio de ligamiento (DL).

Los alelos más frecuentes fueron: *A*02:01:01:01* (0.2552), *A*24:02:01:01* (0.2552), *A*02:06:01* (0.1615), *A*68:03:01* (0.1042), *A*31:01:02* (0.0990), *B*39:05:01* (0.2188), *B*35:14:01* (0.1563), *B*35:17* (0.0990), *B*48:01:01* (0.0625), *B*39:06:02* (0.0521), *DRB1*08:02:01* (0.2396), *DRB1*04:07:01* (0.1927), *DRB1*16:02:01* (0.1771), *DRB1*04:04:01* (0.0938) y *DRB1*04:11:01* (0.0781). Los loci HLA-A y HLA-DRB1 estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW); mientras que HLA-B tuvo una desviación significativa ($p=0.00196$). Los haplotipos más frecuentes (en DL [$p<0.0001$]) fueron: *A*24:02:01:01-B*35:14:01* (0.1040), *A*02:01:01:01-B*35:17* (0.0781), *A*68:03:01-B*39:05:01* (0.0677), *A*68:03:01-DRB1*04:07:01* (0.0781), *B*39:05:01-DRB1*04:07:01* (0.1300), *B*35:14:01-DRB1*16:02:01* (0.1200) y *B*35:17-DRB1*08:02:01* (0.0781).

La peculiaridad de la frecuencia de los alelos *A*68:03:01* y *B*35:14:01* y la consiguiente singularidad de la evolución haplotípica, distinguen a los mixtecos de la Costa del resto de las etnias; incluso, de mixtecos de la Mixteca Alta. Esta variación inter e intraétnica debe considerarse en programas de trasplante de órganos o tejidos y en estudios de asociación genética y farmacogenética.

Palabras clave: grupos étnicos, mixtecos de la Costa, HLA, alelos, haplotipos, frecuencias, desequilibrio de ligamiento.