

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



TÍTULO:

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE UNA COMUNIDAD AUTÓCTONA
DE BAJA CALIFORNIA, EN EL MARCO DEL COMPLEJO
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

BRENDA LINDA ALVARADO ESPINOZA

DIRECTOR DE TESIS:

HORACIO ALMANZA REYES

CO-DIRECTOR DE TESIS:

CARMEN ALAEZ VERNON

Tijuana, Baja California, a 15 de Mayo del 2019.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Director de la tesis titulada "Diversidad genética de una comunidad autóctona de Baja California, en el marco del Complejo Principal de Histocompatibilidad", elaborada por **M.C. Brenda Linda Alvarado Espinoza**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes
Director de tesis

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, a 15 de Mayo del 2019.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como co-directora de la tesis titulada **"Diversidad genética de una comunidad autóctona de Baja California, en el marco del Complejo Principal de Histocompatibilidad"**, elaborada por M.C. Brenda Linda Alvarado Espinoza, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dra. Carmen Alaez Verson
Co-directora de tesis

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, a 15 de Mayo del 2019.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como sinodal de la tesis titulada "Diversidad genética de una comunidad autóctona de Baja California, en el marco del Complejo Principal de Histocompatibilidad", elaborada por **M.C. Brenda Linda Alvarado Espinoza**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dra. Bertha Landeros Sánchez
Sinodal de tesis

C.c.p. Archivo


Tijuana, Baja California, a 15 de Mayo del 2019.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como sinodal de la tesis titulada **"Diversidad genética de una comunidad autóctona de Baja California, en el marco del Complejo Principal de Histocompatibilidad"**, elaborada por M.C. Brenda Linda Alvarado Espinoza, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dra. en C. Mirna del Carmen Brito Perea
Sinodal de tesis

C.c.p. Archivo

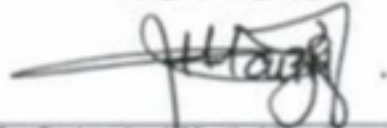
Tijuana, Baja California, a 15 de Mayo del 2019.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como sinodal de la tesis titulada "Diversidad genética de una comunidad autóctona de Baja California, en el marco del Complejo Principal de Histocompatibilidad", elaborada por **M.C. Brenda Linda Alvarado Espinoza**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dr. Carlos José Martín Vera Hernández
Sinodal de tesis

C.c.p. Archivo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



TÍTULO:

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE UNA COMUNIDAD AUTÓCTONA
DE BAJA CALIFORNIA, EN EL MARCO DEL COMPLEJO
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

BRENDA LINDA ALVARADO ESPINOZA

DIRECTOR DE TESIS:

HORACIO ALMANZA REYES

CO-DIRECTOR DE TESIS:

CARMEN ALAEZ VERNON

TIJUANA, B.C., MÉXICO

JUNIO, 2019

DEDICATORIA

Como estrellas en mis noches de soledad, incertidumbre o impaciencia... como motores de mi vida y agentes de motivación en todo lo que emprendo. Con todo mi amor a Víctor René, Sofía Victoria y Erick Xach.

A los dignos miembros de la comunidad kumiai de San José de la Zorra, en especial a Joaquín Montes, Bertha Gabriela Zepeda y Vicente Domínguez, QEPD.

AGRADECIMIENTOS

A mis hijos por su paciencia, cariño y bondad. Dios se los retribuya siempre con más amor, salud y felicidad en sus vidas. Los amo con todo mi corazón.

A mis padres, hermanos y demás miembros de mi familia, por contribuir en mi formación personal y permitirme haber llegado hasta este punto. Gracias Rosy Ramírez por tu constante hospitalidad y apoyo.

A Roy, por su constante estímulo para concluir tan trascendente etapa de mi vida. Gracias por tu paciencia y estímulo.

A mis directores de tesis, el Dr. Almanza y la Dra. Alaez. Es una satisfacción y privilegio haber sido asesorada por personas con su iniciativa, inteligencia, actitud colaborativa y humildad. Gracias por su ejemplo.

A Q.F.B. Iván Velasco, Q.F.B. Blanca Blanco y Dra. Karol Carrillo por todo el apoyo técnico brindado durante el desarrollo del estudio; al Dr. José Luis Osuna, Dra. Melissa Osuna, Dra. Laurie Nieto y Q.F.B. Javier García, por auxiliar en el desarrollo de las entrevistas, así como a los Doctores y Maestros Bertha Landeros, Mirna Brito Perea y Carlos Vera por sus atinadas observaciones y sugerencias durante la revisión de este escrito.

A la comunidad kumiai de San José de la Zorra, en especial al comisariado Gregorio Montes, ex-comisariado Rito Silva y responsable sanitaria Paula Vega por su apertura, orientación y confianza.

Al escultismo, por darme las herramientas necesarias para no dejarme desistir en la vida y buscar de manera constante nuevas metas que lograr; a mis hermanos scouts por su aliento y amistad de por vida.

A esa entidad que nos permite existir, que nos ayuda a explicar lo inexplicable, motivo de paz, inspiración y luz en momentos de desaliento.

INSTITUCIONES DE APOYO



El trabajo descrito fue realizado en el Departamento de Medicina Traduccional del Instituto Nacional de Medicina Genómica bajo la asesoría de la Dra. Carmen Alaez Verson, así como en los laboratorios de Biología Celular de la Facultad de Medicina y Psicología, de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la supervisión del Dr. Horacio Almanza Reyes.



Su desarrollo fue posible gracias al apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del recurso otorgado al proyecto con clave de registro 201204.

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes
Facultad de Medicina y Psicología
Universidad Autónoma de Baja California

Dra. Carmen Alaez Verson
Laboratorio de Medicina Traduccional
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dra. Bertha Landeros Sánchez
Facultad de Cs. Químicas e Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja California

Dra. María del Carmen Brito Perea
Facultad de Cs. Químicas e Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja California

Dr. Carlos José Martín Vera Hernández
Facultad de Medicina y Psicología
Universidad Autónoma de Baja California

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
dNTP	Dinucleótidos trifosfatados
GWAS	Por sus siglas en inglés, de Estudios de Asociación a Nivel Genómico
HLA	Por sus siglas en inglés, de Antígenos Leucocitarios Humanos
IgG	Inmunoglobulina G
INF-γ	Interferón gama
KDa	Kilodaltons
KIR	Por sus siglas en inglés, de receptores de células naturales asesinas, similar a inmunoglobulinas
Mb	Megabases
min	Minutos
mL	Mililitros
N	Concentración normal
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NK	Por sus siglas en inglés, de células naturales asesinas
NRY	Por sus siglas en inglés, de cromosoma "Y" no recombinante
PBR	Por sus siglas en inglés, de región de unión al péptido
pM	Concentración picomolar
RFLPs	Por sus siglas en inglés, de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SBT	Por sus siglas en inglés, de tipificación basada en secuenciación
SNG	Secuenciación de nueva generación
SNP	Por sus siglas en inglés, de polimorfismos de un solo nucleótido
SSO	Por sus siglas en inglés, de hibridación de oligonucleótidos secuencio-específica
SSP	Por sus siglas en inglés, de oligonucleótidos de secuencia específica
STR	Por sus siglas en inglés, de repeticiones cortas en tándem
UTR	Por sus siglas en inglés, de regiones sin traducir
VNTR	Por sus siglas en inglés, de repeticiones en tándem de número variable
xCPH	Región extendida del Complejo Principal de Histocompatibilidad

RESUMEN

La Nación kumiai es parte del complejo cultural yumano. Se encuentra diseminada en los estados de Arizona y California en Estados Unidos de América, y en Sonora y Baja California, México. San José de la Zorra es una de sus cuatro comunidades en Baja California, cuya población es cercana a los 200 habitantes. Su perfil HLA de clase I y II no se ha explorado previamente. El propósito de esta investigación fue obtener una tipificación de alta resolución del HLA de clase I y II para un grupo de individuos de esta comunidad.

El estudio se realizó en 35 personas distribuidas en 12 familias, que aceptaron participar y firmaron un consentimiento informado. Se extrajo ADN a partir de sangre periférica utilizando el Maxwell 16. Se hizo una tipificación de alta resolución a través de SNG, el paquete de reacciones *TruSight HLA* y el instrumento *Miseq*, de la compañía Illumina. Para el análisis de secuencias se usó el programa informático *Assign*. Las frecuencias de alelos y haplotipos se calcularon mediante el "Individuo menormente relacionado" (HLA-net.eu).

Se identificaron un total de 29 haplotipos diferentes agrupados en bloques de 11 genes. Ninguno de ellos de origen europeo o africano. El perfil alélico encontrado en los haplotipos amerindios fue restringido, con dos o tres alelos en cada locus, aportando un 40-50% del total. Los alelos más frecuentes en cada locus fueron: A*02:06, 68:01, 31:01; B*40:02, 27:05, 35:01; C*03:04, 02:02, 04:01, DRB1*14:02, 08:02, 16:02; DQB1*03:01, 04:02, 02:01 y DPB1*04:01, 04:02. Adicionalmente el perfil es muy distinto al encontrado en seris, que viven también al Noroeste de México pero pertenecen a otro tronco lingüístico; por ejemplo en seris, B*27:05 y DRB1*14:02 se encuentran prácticamente ausentes. El hallazgo de un 60% de haplotipos no amerindios, puede explicarse parcialmente como resultado del mestizaje entre migrantes españoles e ingleses que en el siglo XIX llegaron a colonizar la península.

SUMMARY

The kumeyaay Nation is part of the yuman cultural complex. It is disseminated along the states of Arizona and California in the United States of America, as well as the states of Baja California and Sonora in Mexico. San José de la Zorra is one of its four communities in Baja California, with a population of around 200 people. The HLA class I and II profile has not been previously explored for them. The aim of this study was to obtain high-resolution HLA class I and class II typing for a group of persons from this community.

The study was performed in 35 individuals belonging to twelve families, who agreed to participate and sign an informed consent. DNA (Deoxyribonucleic acid) was extracted from peripheral blood using Maxwell 16. HLA high-resolution typing was performed through NGS (Next Generation Sequencing) using the TruSight HLA kit and the Miseq, Illumina. The sequence analysis was done with the Assign software. Allele and haplotype frequencies were calculated from “less related individual” (HLA-net.eu).

A total of 29 different haplotypes grouped in 11 gene blocks, were identified. Nine of them were from a European or African origin. The allele profile found in Amerindian haplotypes was restricted, with two or three alleles in each locus adding around 40-50% of the total. The most frequent alleles in each locus were: A*02:06, 68:01, 31:01; B*40:02, 27:05, 35:01; C*03:04, 02:02, 04:01, DRB1*14:02, 08:02, 16:02; DQB1*03:01, 04:02, 02:01 and DPB1*04:01, 04:02. Additionally, the profile is very different from the one found in seris, that also live in Northwest Mexico, but belong to a different linguistic trunk; for example, in seris B*27:05 & DRB1*14:02 are almost absent. The presence of 60% of non-Amerindian haplotypes can be explained, partially, as the result of admixture with Spaniard and English migrants that arrived at the peninsula in the 1800s.

LISTA DE FIGURAS

1. Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad.
2. Estructura peptídica de los antígenos HLA de clase I y clase II
3. Vías de procesamiento antigénico.
4. Distribución geográfica de la familia etnolingüística yumana.
5. Diagrama de flujo para el uso de panel de secuenciación
6. Posición de las muestras para el desarrollo de las reacciones de PCR.
7. Ejemplo de colocación de los índices.
8. Ejemplo de distribución general de índices para el ensayo de un lote de muestras.
9. Hojas de muestras
10. Ruta de importación de datos
11. Panel de resultados visualizado a través del programa *Conexio Assign*.
12. Frecuencias alélicas de los genes HLA-A
13. Frecuencias de los alelos del gen HLA-B
14. Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-C
15. Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DRB1
16. Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DQA1
17. Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DQB1
18. Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DPA1
19. Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DPB1
20. Distribución de alelos acorde a frecuencias encontradas y grupo étnico asociado
21. Distribución de haplotipos acorde al grupo étnico de origen
22. *Pedigrees* de 7 familias nucleares
23. *Pedigrees* de las 5 familias nucleares restantes

24. Distribución por sexo
25. Distribución por rangos de edad
26. Distribución por estado civil
27. Distribución acorde al nivel de dominio del idioma kumiai
28. Distribución por escolaridad
29. Distribución por tipo de ocupación
30. Distribución acorde a tipos de hábitos
31. Distribución por tipo de grupo sanguíneo
32. Distribución por nivel de glicemia o hemoglobina/glóbulos rojos
33. Distribución acorde a antecedentes fisiopatológicos

LISTA DE TABLAS

1. Relación de algunos genes HLA asociados a distintas poblaciones del mundo
2. Datos demográficos de la comunidad kumiai de San José de la Zorra.
3. Enfermedades reportadas de mayor incidencia
4. Preparación de muestras y estándares para su cuantificación por fluorometría
5. Condiciones de amplificación de los genes HLA
6. Programa para la incorporación de los índices
7. Frecuencias genotípicas de alelos de clase I
8. Frecuencias genotípicas calculadas para los alelos DQA1, DQB1, DPA1 y DPB1 de clase II
9. Frecuencias genotípicas calculadas para los alelos DRB1/3/4/5 de clase II
10. Distribución de genotipos homocigotos y heterocigotos en los individuos analizados

11. Distribución de haplotipos con genes de clase I (izquierda) o clase II (derecha).
12. Frecuencias genotípicas y fenotípicas de los marcadores de grupos sanguíneos

LISTA DE ANEXOS

1. Historia clínica
2. Consentimiento informado
3. Carta de confidencialidad
4. Principios de la declaración de Helsinki
5. Trabajo presentado derivado de la investigación

ÍNDICE

DEDICATORIA	VIII
AGRADECIMIENTOS	IX
SUMMARY	XIV
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABLAS	XVI
LISTA DE ANEXOS	XVII
INTRODUCCION	1
CAPITULO I. OBJETO DE ESTUDIO	2
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Justificación	3
1.3. Hipótesis	5
1.4. Objetivo general	5
Obtener el perfil genético HLA de indígenas kumiai, de la comunidad de San José de la Zorra.	5
1.5. Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
CAPÍTULO III. MÉTODO	30
3.1. Diseño de investigación	30
3.2. Muestreo y sujetos	30
3.3. Ámbito de estudio	31
3.4 Variables de estudio	31

3.5. Materiales	32
3.5.1 Equipos de reacciones	32
3.5.2 Otros reactivos	32
3.5.3 Instrumentos	33
3.5.4 Apoyo computacional	34
3.6 Estrategia metodológica	34
3.7.4.3. Cuantificación en NanoDrop 1000	39
3.7.4.4 Cuantificación con el fluorómetro Qubit 2.0	40
3.7.4.5 Secuenciación de siguiente generación (NGS)	42
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	59
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	80
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	85
CAPÍTULO VII. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	86
7.1 LIMITACIONES	86
7.2 PERSPECTIVAS	87
REFERENCIAS	88
ANEXO 1. HISTORIA CLINICA	97
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO	99
ANEXO 3. CARTA DE CONFIDENCIALIDAD	102
ANEXO 4. PRINCIPIOS DE DECLARACION DE HELSINKI	103
ANEXO 4. TRABAJO DERIVADO DE LA INVESTIGACIÓN	106

INTRODUCCION

La especie humana se divide en grupos étnicos genéticamente distinguibles cuyas diferencias son establecidas con base en mutaciones génicas, o incluso factores ambientales que acorde al medio en el que habitan, hábitos y costumbres, determinan la expresión de sus genes. El enfoque del estudio se vincula con la genética de poblaciones, para analizar la forma en que integrantes de una comunidad de la región noroeste del país, mantiene o cambia las frecuencias genotípicas y alélicas de algunos marcadores moleculares, así como también, valorar cómo estos genes o sus condiciones de vida pudiesen afectar su condición general de salud.

Entre grupos poblacionales, las frecuencias alélicas tanto de genes causantes de enfermedad como otros no patógenos, son muy distintas. La identificación de individuos y las características epidemiológicas de comunidades se han elucidado gracias a la tipificación de etiquetas génicas como son por ejemplo, las proteínas del CPH. La información que emana de ello, permite correlacionar ese perfil generado y el riesgo o resistencia, a desarrollar alguna enfermedad con base en la incidencia de la misma, en la población en estudio. Permite además tener una mejor noción acerca de la migración de su ascendencia, para conocer aspectos como su lugar de origen o la forma en que se relaciona biológicamente con otras etnias.

CAPITULO I. OBJETO DE ESTUDIO

El CPH es un conjunto de genes localizados en el cromosoma 6, que a su vez se dividen en tres grupos, cada uno altamente polimórfico. Los de clase I codifican para proteínas integrales de células nucleadas, y los de clase II para antígenos expresados en linfocitos B, macrófagos, monocitos, células endoteliales y linfocitos T activados. Uno de marcadores comúnmente analizados en la genética de poblaciones son aquellos pertenecientes a estas clases, razón por la cual han sido seleccionadas como objeto en esta investigación.

La población blanco sobre la cual se desea enfocar el análisis es la etnia kumiai, que vive en el Estado de Baja California. Los 229 miembros de la comunidad de San José de la Zorra corresponderían a la población accesible. Sin embargo la población elegible constan de 182 individuos, que son los que habitan actualmente en la comunidad. Aquellas personas que firmaron el consentimiento informado y asintieron, representan la población de estudio y considerando que todos ellos fueron sujetos de análisis, también representan la muestra.

La investigación se hizo en el transcurso de año y medio en la cual se contactó con el comisionario de la comunidad y la responsable de salud de la misma. La responsable de salud de San José de la Zorra canalizó a los investigadores con los miembros de la comunidad para la presentación del proyecto. Posteriormente se fue desarrollando la labor de campo para la obtención de consentimiento informado y las muestras. Éstas fueron procesadas y analizadas en una institución externa.

1.1. Planteamiento del problema

A través de este estudio, se plantean las siguientes preguntas: ¿Existirá un alelo nuevo, no descrito previamente en la literatura, que pueda encontrarse entre los individuos en estudio? ¿Existe algún alelo o conjunto de alelos particulares para la etnia en estudio? ¿Existe una relación genética –en el marco del Complejo Principal de Histocompatibilidad- entre la etnia kumiai y otras etnias descritas en la literatura? ¿Habrá una relación entre los marcadores identificados y las características epidemiológicas de la población en estudio? El perfil genético de las poblaciones amerindias, le confieren a los miembros de sus comunidades características muy particulares, difíciles de compartir, como es de esperarse cuando se estudian genes muy polimórficos como los HLA. Aunado a su cultura e idiosincrasia, esto dificulta el desarrollo de intervenciones sociales o biológicas, *a doc* a sus necesidades, por lo que la elucidación de estrategias adecuadas para ello, dependen del conocimiento escaso que se tenga de la población o del conocimiento de poblaciones con las cuales se sabe que guardan una estrecha relación. En este sentido, se espera comenzar a contribuir con esta labor a través de la generación de ciencia básica, aplicable de manera interdisciplinaria. Esto permitiría establecer una relación biológica de esta etnia con otras, identificar alguna condición de resistencia y/o susceptibilidad a alguna enfermedad, así como contrastar el proceso de migración de sus ancestros, reportado en la literatura antropológica, respecto a los hallazgos en términos genéticos.

1.2. Justificación

En México se han descrito estudios realizados en decenas de grupos étnicos, lo que ha facilitado comprender la estructura de subpoblaciones

humanas y ofrecer aportaciones antropológicas y genéticas. Hasta el momento, no se ha extendido en gran medida la investigación en grupos de la península bajacaliforniana, lo que podría ofrecer una oportunidad de generar información innovadora y de impacto por lo menos para las 68 poblaciones amerindias del país, además de los grupos yumanos mohave, cocopah, maricopa, quechan, hualapia, havasupai, yavapai y kumeyaay distribuidos al suroeste de Estados Unidos, con los que mantienen una relación estrecha acorde a sus antecedentes históricos. La identificación de alelos HLA y los haplotipos particulares de poblaciones indígenas puede permitir estudiar más ampliamente la epidemiología de desórdenes asociados a estos marcadores, establecer programas de trasplante en áreas rurales y sugerir estrategias para conservar poblaciones que se encuentren en peligro de extinción.

El uso de tecnologías como la NSG es de especial interés por la cantidad y calidad de información que proporciona, en especial cuando se trabajan de manera simultánea con marcadores muy polimórficos como son los genes HLA y cuando es necesario identificar mutaciones que otras tecnologías como la secuenciación *Sanger* no puede detectar. Considerando que el estudio se enfocó a una de las 4 comunidades kumiai del Estado, y la cantidad de individuos analizados es limitada, los hallazgos no se pueden generalizar a toda la etnia, sin embargo puede proveer los antecedentes necesarios para hacer un acercamiento más estrecho con los grupos y generar una estrategia más fina de investigación, dirigida no sólo a análisis familiares sino a un estudio poblacional. Con la investigación, se esperó obtener información que pudiese ayudar a determinar uno o varios haplotipos característicos de las poblaciones yumanas en la península de Baja California y una fuerte asociación entre éstos y los que se han determinado hasta el momento en varias poblaciones amerindias, en especial aquellas que habitan al norte del país y al suroeste de Estados Unidos. Los resultados son un parteaguas para diseñar un estudio más generalizado de

la población kumiai en Baja California, México y en California, Estados Unidos, así como para sentar bases de otras investigaciones dirigidas a otras etnias en Baja California como pai pai y cucapah y kiliwa que se encuentra en peligro de extinción, en el mismo Estado.

1.3. Hipótesis

Hipótesis de investigación H_i : Existe por lo menos un haplotipo característico de individuos pertenecientes a la etnia kumiai del Estado de Baja California.

Hipótesis nula H_0 : No existe un haplotipo característico de individuos pertenecientes a la etnia kumiai del Estado de Baja California.

1.4. Objetivo general

Obtener el perfil genético HLA de indígenas kumiai, de la comunidad de San José de la Zorra.

1.5. Objetivos específicos

- ⤴ Obtener la frecuencia alélica HLA-A, HLA-B y HLA-C de clase I de los individuos en estudio.
- ⤴ Obtener la frecuencia alélica HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 y HLA-DRB1 de clase II de los individuos en estudio.
- ⤴ Obtener las frecuencias haplotípicas de combinaciones de 3 loci para alelos

de clase I y clase II, así como las frecuencias haplotípicas de los 8 loci analizados.

- ✦ Identificar alelos de susceptibilidad o resistencia a patologías con base en el perfil HLA generado y contrastarlo con sus antecedentes epidemiológicos.

Capítulo II. MARCO TEÓRICO

2.1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad

2.1.1 Organización genómica

El CPH es una unidad de genes que se encuentra en todas las especies a partir de *Xenopus laevis*. Su función principal es la presentación de antígenos, es decir está involucrado en la respuesta inmune (relación con procesos infecciosos, autoinmunidad y trasplante). En humanos, el CPH se encuentra en el cromosoma 6p21.3 y es llamado complejo HLA. Su primer mapa se describió en 1993, posteriormente en 1999, se presentó una versión más completa a la que llamaron "clásica" y en 2003 se definió una versión de 7.6 Mb de longitud, a la que denominaron "extendida". En este nuevo mapa existen 5 regiones: la región de clase I extendida (3.9 Mb), región de clase I clásica (1.9 Mb), región de clase III (0.7 Mb), región de clase II clásica (0.9 Mb) y región de clase II extendida (0.2 Mb). El xCPH contiene un número total de 421 loci, de los cuales 30% se expresan de forma codominante, 7% se transcriben y 139 son pseudogenes^{1-3,5}. La región HLA de clase I, que se encuentra en la región más telomérica del CPH, se compone de genes clásicos como son los HLA-A, -B y -C que tienen la función de codificar proteínas involucradas en la presentación de antígenos peptídicos a linfocitos T CD8⁺, además de genes no clásicos como HLA-E, -F, y -G entre otros, que sirven como ligandos de receptores de células NK (Fig. 1).

La región HLA de clase II, que se encuentra más cerca del centrómero, contiene genes que codifican para moléculas presentadoras de antígenos (HLA-DR, -DQ, -DP) y de procesamiento antigénico (HLA-DM, -DO). Las primeras pueden presentar antígenos a los linfocitos T CD4⁺ y los HLA-DM y -DO se

encuentran involucrados en el intercambio peptídico y en la "carga" del antígeno a las moléculas DR, DQ y DP^{1,4-5}. El juego de alelos que de manera mendeliana es heredado por cada padre (y al que por lo tanto se le denomina haplotipo HLA), presenta un desequilibrio de ligamiento significativo debido a la cercanía entre ellos. De esta forma, a menos que haya algún evento de recombinación, cada haplotipo de un hijo, es compatible con un haplotipo de cada uno de los padres^{1,5}.

Aunque todos los genes de clase I y II emergieron por duplicación y divergencia del mismo ancestro común, en la actualidad se describen más de 10,770 proteínas HLA de clase I y II casi todas codificadas, por genes altamente polimórficos. Por ejemplo del gen HLA-B se distinguen 4,358 alelos distintos, el HLA-A posee 3,492, el HLA-C tiene 3,111 y el HLA-DRB abarca 2,135. Las diferencias en las proteínas para las cuales codifican son principalmente en la región extracelular, con la que se une a los antígenos e interactúa con los receptores de linfocitos T; los polimorfismos de estas proteínas homólogas se encuentran regularmente en las cadenas α -1 y α -2 (exones 2 y 3) de los HLA de clase I, y en las cadenas α -1 y β -1 (exón 2) de los HLA de clase II. Por el otro lado, algunos de estos antígenos tiene alto grado de conservación como son los genes HLA-DRA y DMA con tan solo 7 alelos, o 6 para el caso de DPB2^{5,6}.

2.1.2 Expresión y estructura proteica

Tanto las proteínas de clase I como las de clase II son moléculas heterodiméricas expresadas de manera codominante. Las primeras lo hacen en prácticamente todas las células nucleadas y las segundas, en células dendríticas, linfocitos B, macrófagos, células vasculares endoteliales, células epiteliales y células mesenquimales.¹

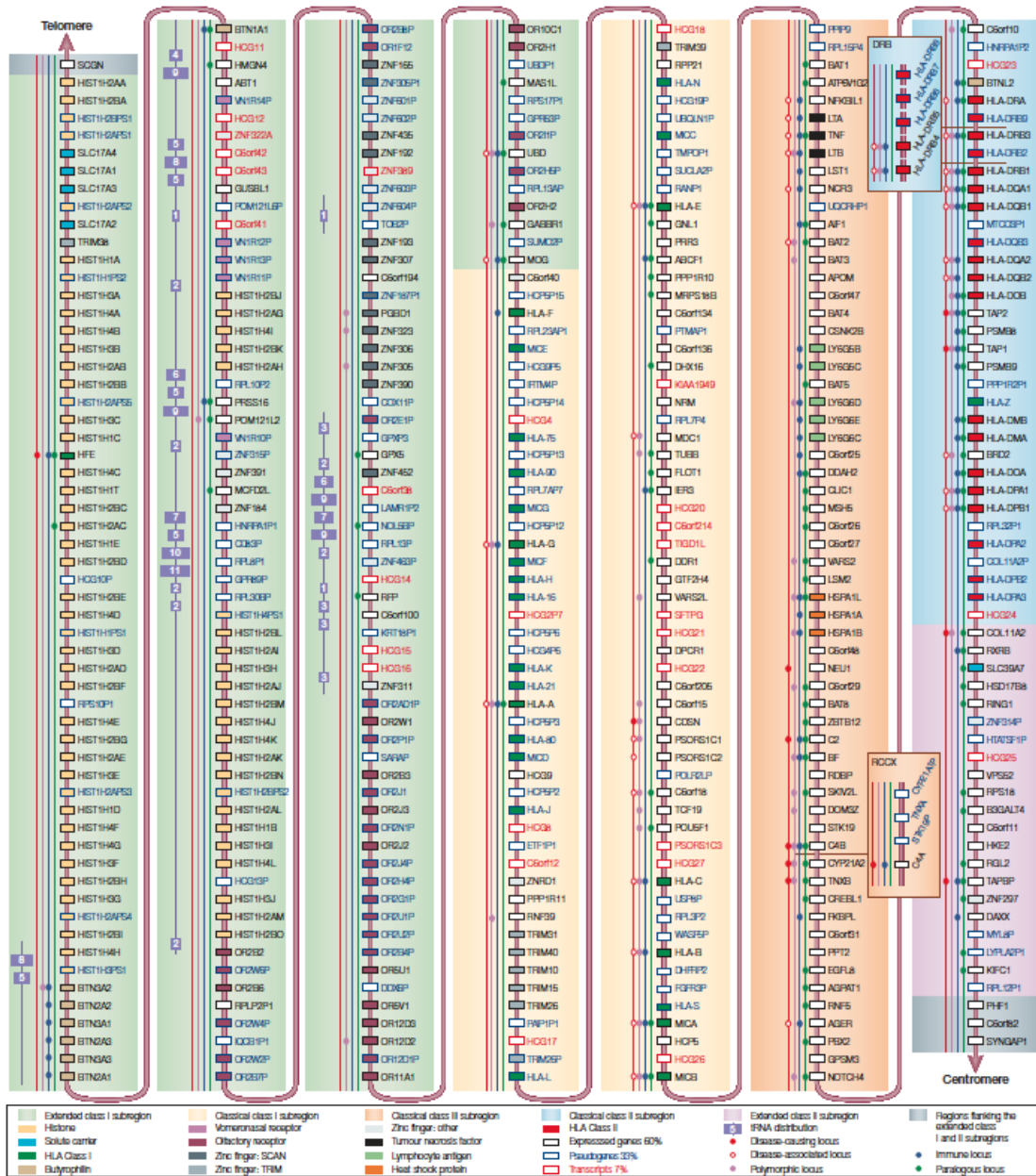


Figura 1. Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad.⁴ Se visualiza el mapa el brazo corto del cromosoma 6 desde la región del telómero hacia el centrómero; la subregión extendida de clase I, la clásica de clase I, la clásica de clase III, la clásica de clase II y la extendida de clase II, se encuentran sombreadas de color verde, amarillo, anaranjado, azul y rosa respectivamente. Adicionalmente los genes de clase I se señalan como pequeños bloques rectangulares verde oscuro y los de clase II en color rojo.

En el caso de las de clase I, la cadena α de 44-47 KDa codificada por el gen HLA se une no covalentemente a la proteína de 12 KDa de la β 2-microglobulina que es codificada por el cromosoma 12 (Fig. 2). Parte de la cadena α queda expuesta al medio intracelular, mientras que la mayor parte de ella se expone como receptor; en el caso de la β 2-microglobulina, toda la cadena polipeptídica se expone al medio extracelular. Dos de los dominios que forman la cadena α , forman un pocillo con características muy particulares: acomodan péptidos cuyo tamaño oscila entre 8-11 aminoácidos, su conformación es extendida, profunda y flexible, y los extremos de ese pocillo o hendidura están cerrados, por lo que no se le pueden unir proteínas de gran tamaño; el tercer dominio, el más cercano a la membrana plasmática (extracelular), sirve en la interacción con el receptor de linfocitos T^{1,5,7}.

Las moléculas de clase II se componen de una cadena α de 32-34 KDa codificada por el gen A de un locus (ya sea HLA-DP, -DQ, o -DR), unida no covalentemente con una cadena β de 29-32 KDa, que se codifica por el gen B que pertenece al mismo locus. En el caso de la región genómica del HLA-DR, ésta contiene un gen funcional para la cadena α (DRA1), pero tiene 1 o 2 genes funcionales para la cadena β (DRB1, y DRB3, -4, -5). Basados en esto último, es posible heredar 3 o 4 alelos de cada padre, un juego de DP, uno de DQ y uno o dos de DR, para tener un total de 6 a 8 alelos de clase II.

El primer dominio tanto de la cadena α como β , forman un pocillo no muy profundo a través de cual presentan péptidos de un tamaño de 10-30 aminoácidos aproximadamente, y cuyos extremos, a diferencia del que generan los otros antígenos HLA, son más abiertos^{1,5,7}.

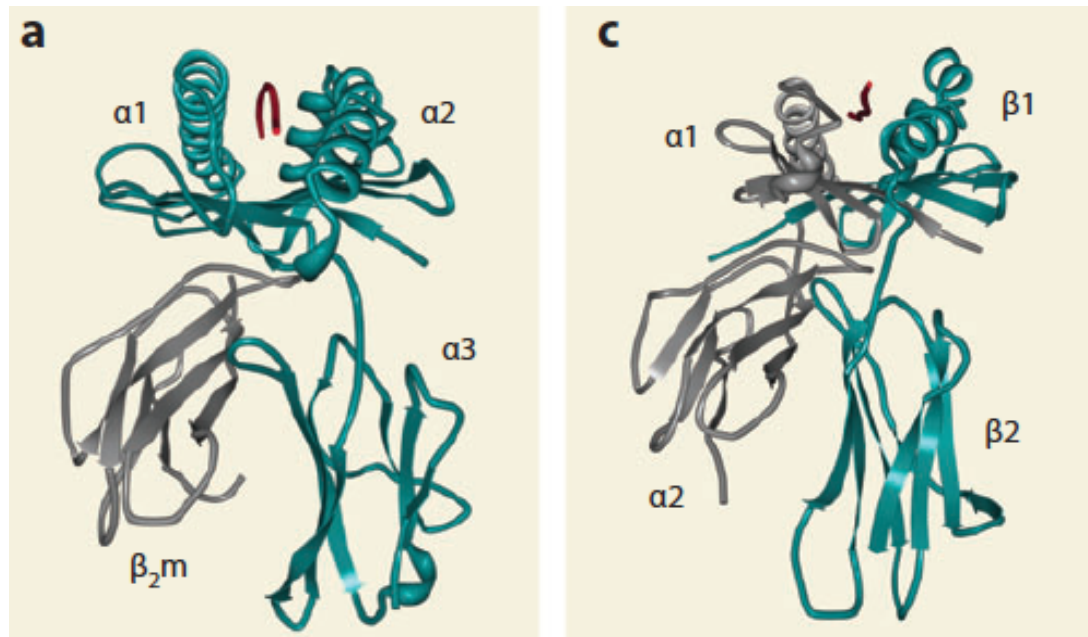


Figura 2. Estructura peptídica de los antígenos HLA de clase I y clase II.⁸ En la parte izquierda se aprecia el polipéptido β_2 -microglobulina (gris) y su unión con la proteína HLA de clase I (color verde), cuyos dominios α_1 y α_2 forman el bolsillo de unión a péptidos; Del lado derecho, el dominio α_1 de una proteína HLA de clase II (gris), se une con el dominio β_1 de la proteína correspondiente (verde) para la generación de la hendidura característica.

2.1.2 Función y significado biológico

La función del sistema inmunológico radica en oponer resistencia a la infección o enfermedad que pudiera causar un patógeno, lo que se evidencia a través de la acción ya sea de barreras naturales, células, moléculas de señalización o de moléculas efectoras. En primera instancia entra en juego la inmunidad innata a través de barreras físicas y químicas, factores del complemento, mediadores de la inflamación, células fagocíticas o tipos especializados de linfocitos. Sin embargo, esto no es siempre suficiente para contraatacar la actividad del agente invasor, por lo que la amplificación y velocidad de respuesta del huésped se comienza a regular por los linfocitos, citocinas y anticuerpos que se activan o generan durante la inmunidad específica.

El repertorio de linfocitos que pudiera ayudar en la eliminación de los patógenos (especialmente microbios intracelulares) es limitado, por ello se emplean células presentadoras de antígenos distribuidas ampliamente en los diversos tejidos, para capturar y degradar los microorganismos, así como para desplegar sus péptidos antigénicos. De esta manera, al transportarlos posteriormente a los órganos linfoides, se puede favorecer la activación de linfocitos T, por la presentación de proteínas exógenas pequeñas, y linfocitos B, que pueden reconocer cualquier tipo de biomolécula. Regularmente los patógenos entran al huésped a través de la piel o el epitelio gastrointestinal o respiratorio, donde se tienen capilares linfáticos a través del cual migran los microorganismos de manera libre o capturados por la célula presentadora de antígeno (célula dendrítica, macrófago o linfocito B); también, los antígenos que hayan llegado a los vasos sanguíneos, puede ser presentados por células vasculares endoteliales o bien, aunque en menor cantidad y bajo el estímulo de **INF- γ** , por fibroblastos y células epiteliales. De una manera u otra el propósito es convertir esos agentes extraños en moléculas con las que se pueda asociar la proteína HLA y expresarse con ella en la superficie de las células presentadoras (Fig. 3).^{1,7,10}

Si el antígeno fuese producto de células tumorales, microbios intracelulares o de proteínas que recientemente hayan sido sintetizadas pero se encuentren mal plegadas, el proteosoma, un complejo supramolecular catalítico, se encargaría de digerirlo en péptidos de corta longitud. Posteriormente estos péptidos, traslocados al retículo endoplasmático, se unirían con la proteína HLA de clase I en proceso de síntesis, para luego expresarse en la superficie de la célula presentadora. De esta forma, los complejos pueden ser reconocidos por linfocitos T CD8⁺ a través de su receptores celulares.^{1,7,20}

En cambio, si se internalizan antígenos extracelulares a través de vesículas o se generan vesículas producto de la degradación de componentes intracelulares, éstas proceden a fusionarse con lisosomas y ocurre la degradación catalítica.

Por otro lado, las moléculas HLA de clase II se sintetizan en el retículo endoplasmático y a través del tráfico vesicular son enviadas a fusionarse con las vesículas lisosómicas en cuyo contenido ahora residen péptidos derivados de la degradación del antígeno.

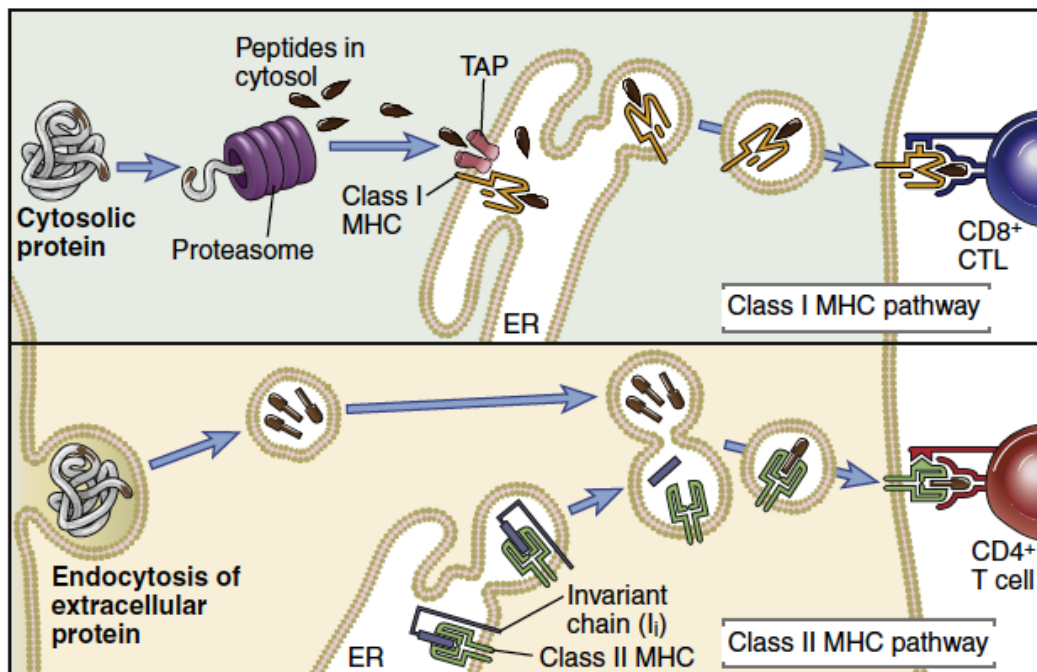


Figura 3. Vías de procesamiento antigénico.⁹ En la vía del CPH de clase I que se muestra en la parte superior de la figura, los antígenos proteicos del citosol son degradados por proteosomas y sus productos son enviados a unirse con el CPH clase I para ser expresados en la superficie de la célula. En la parte inferior de la figura se puede visualizar cómo los antígenos exógenos endocitados y digeridos por la célula son unidos y expresados junto con las moléculas HLA de clase II.

Después de esto, las moléculas HLA de clase II se unen al péptido correspondiente y son expresadas sobre la superficie celular para su reconocimiento por linfocitos T CD4⁺ 1,7

2.2 HLA y su diversidad en poblaciones

2.2.1 Importancia de estudios de HLA en poblaciones

Los estudios de genética poblacional tienen un impacto importante en diversas disciplinas como son la epidemiología, historia, antropología, psicología, farmacología, medicina preventiva, diagnóstico clínico y nutrición. Considerando que cada población tiene características muy particulares, dadas por sus antecedentes históricos, ambiente y relaciones sociales, hábitos y costumbres, la información que emana de los hallazgos de la genética poblacional, permite diseñar estrategias para comprender procesos sociales o fisiológicos de los individuos y responder para satisfacer sus necesidades basados en dichas características.

Existen una gran variedad de marcadores que son de utilidad para la genética poblacional, desde los apellidos, que de alguna manera se heredan como los alelos y haplotipos del cromosoma, hasta el uso de los grupos sanguíneos, polimorfismos de proteínas, de genes, microsatélites, SNPs, haplotipos. El estudio de estos marcadores ha sido de utilidad para realizar determinaciones de patrones migratorios, estructura poblacional, ancestría, relación parental, procesos de adaptación a diferentes ambientes (*i.e.* clima, costumbres alimenticias y exposición a ciertos agentes) o capacidad de resistencia o desarrollo de enfermedad.^{11,12}

Gracias a los GWAS, se han podido realizar búsquedas en todo el genoma, para detectar esos marcadores que estadísticamente tienen correlación con el objeto de estudio y pueden ser blanco de estudios más finos

para profundizar en el conocimiento y comprensión de esa asociación. A pesar de que la región del CPH sólo comprende el 0.13% del genoma humano, se ha identificado que el 6.4% de los SNP asociados con enfermedades se encuentran en esta región, lo que sugiere su contribución importante en dichos procesos. Es conocido que la región del CPH contiene una gran densidad génica y elevado desequilibrio de ligamiento, por ello también representa una zona útil para inferir la historia de una población y su demografía; en poblaciones con gran ancestría su recombinación es baja, en poblaciones pequeñas y aisladas se exhiben regiones de fuerte desequilibrio (muy probablemente a causa de deriva génica). Adicionalmente las frecuencias de genotipos homocigotos aumentan cuando el sistema de parentesco utilizado no es al azar, la frecuencia de algunos alelos o haplotipos HLA aumentan cuando han pasado por un proceso de adaptación ambiental o resistencia a enfermedad (positiva o negativa), incluso a través de simulaciones basadas en datos de secuenciación de genes HLA se han podido estimar parámetros de evolución molecular.¹¹⁻¹⁴

Una de las técnicas que cada vez que utiliza más para la tipificación de genes HLA, con el propósito de elucidar los eventos mencionados previamente es la SNG. Comúnmente se utilizaban otras técnicas moleculares con las que se identificaban como SSP, SSO o SBT, sin embargo con la llegada de la tecnología de la secuenciación masiva en paralelo, se ha aumentado la eficiencia de la tipificación, se evita utilizar demasiado tiempo para la generación frecuente de oligonucleótidos cada vez que surge un alelo nuevo, la información que se puede obtener de ella es más abundante, ofrece una mayor cobertura, es posible analizar una mayor cantidad de muestras (lo que resulta necesario sobre todo para tener mayor probabilidad de encontrar alelos poco comunes), es posible establecer la fase de los polimorfismos por lo que el número de ambigüedades es mucho menor que el resultante de la

secuenciación de Sanger. Adicionalmente, la información obtenida no se limita a las regiones de unión a péptidos, que implica sólo secuenciar los exones 2 y 3 para los loci de clase I o el exón 2 para los loci de clase II, ya que otros exones, pueden también influir en la capacidad de expresión génica o pueden representar regiones importantes para el mantenimiento de la integridad estructural de los productos génicos.¹³⁻¹⁴

2.2.2 HLA y su diversidad en poblaciones

Otra de las áreas en las que se aprecian las aplicaciones de la genética poblacional es en la antropología molecular, con el propósito de conocer aspectos relacionados con la evolución y diversidad humana. A través de esta disciplina se analizan patrones de variación genética, se realizan comparaciones con otras especies, se recupera información genética de especímenes antiguos para rastrear la historia y origen de las poblaciones así como de las enfermedades, para poder elucidar cómo estas últimas se pudieron esparcir a través del mundo. Los marcadores comúnmente utilizados para el análisis eran inicialmente el ADN mitocondrial y NRY. Posteriormente se identificó el uso potencial de los grupos sanguíneos, así como de productos génicos como los antígenos HLA, IgG e isoenzimas, hasta llegar al uso actual de los RFLPs, VNTR, STR, inserciones *Alu* y genes de susceptibilidad a enfermedad (HLA de amplio uso actual o KIR, con reciente aplicación). En esta área, las plataformas de secuenciación masiva también han jugado un papel importante para inferir tiempos de divergencia poblacional, migración, identificación de poblaciones admixtas, cambios en tamaño de la población y otros aspectos de historia demográfica.¹⁵⁻¹⁸

Hasta el momento se ha reportado una gran diversidad de ensayos realizados en grupos poblacionales alrededor del mundo, donde los marcadores HLA han evidenciado tener un rol trascendente en su identificación. Las

regiones donde se encuentran los loci de clase I y II cobran particular importancia y en especial alelos HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1 se han identificado como étnico-específicos.¹⁹⁻²⁰ Su uso para la caracterización de poblaciones ha logrado establecer asociaciones tanto de alelos como haplotipos acorde a las frecuencias en los que estos aparecen, y que pueden incluso compartirse o ser únicos de los individuos en estudio. Esto a su vez, lleva al desarrollo de hipótesis en torno a parentescos, relaciones ecológicas, fenómenos evolutivos, entre otros aspectos y permite su entendimiento cuando se asocian estos eventos a los antecedentes históricos de los grupos en cuestión. La tabla 1, permite conocer algunos marcadores HLA encontrados a través de técnicas serológicas o moleculares. Existen alelos típicos por regiones, sin embargo son asociados a los grupos caucásicos en general los alelos DRB1*01:01,03:01,04:01,07:01 y 15:01, así como DQB1*02:01, 02:02,03:01,03:02,05:01,06:02. El alelo DRB1*08:04:01 es reconocido como de origen africano. Los alelos DRB1*08:03 y 08:02:01, DQA1*01:03 y 04:01, así como DQB1*06:01 y 04:02 son de origen asiático. Adicionalmente hay algunos que son de especial importancia para este estudio puesto que son de origen amerindio, tal es el caso de HLA-A*02,24,31,68 y 33, HLA-B*35,3951,60,61,62, HLA-C*04,07,03, DRB1*04,02,08,07,12,14, DQA1*04:01, así como DQB1*01,03,07 y 04:02. Los grupos yucpas y nukak mencionados en la tabla con etnias sudamericanas (Colombia), los pimanos, havasupai, seris y mayos son norteamericanas (de Estados Unidos los dos primeros y de México los últimos), los otomíes son originarios de mesoamérica (México). Comparados con poblaciones en otras partes del mundo es lógico comprender, por qué entre estos grupos habría mayores similitudes en los marcadores comparados con los que se ubican en otras regiones del mundo, y más aún entre los que viven en ecosistemas similares. Todos los marcadores tienen un ancestro común, que a medida que el hombre fue descendiendo por el continente luego de arribar a él

por primera vez, fue dejando su huella y modificándose con las sucesivas corrientes migratorias de Asia, Europa y África.

2.3 Primeros pobladores de Baja California y el grupo kumiai

2.3.1 Historia

La historia de los primeros pobladores de California se vincula con el complejo San Dieguito (al sur de la denominada "Alta California" o al norte de lo que ahora es Baja California, México), que a su vez, probablemente se originó de un grupo que vivía en las inmediaciones del lago Mójave, Estados Unidos hace 20,000 años. Se considera que su llegada a Baja California hace 7,000-10,000 años, haya sido mediante migraciones por tierra de norte a sur, aunque algunos autores plantean la posibilidad de que haya sido a través de navegaciones interoceánicas, en cuyo caso sugeriría un origen melanésico en la población. La intensa sequía al término de la última glaciación (hace aproximadamente 8000 años) los pudo haber orillado a migrar posteriormente y formar los complejos prehistóricos La Jolla (al norte de San Diego California, E.U.), el complejo de la Cueva del Pinto (Arizona, E.U.), el complejo de la Cueva Gypsum (Arizona, E.U.) y el complejo Clovis (Nuevo México, E.U.). Debido a los continuos cambios climáticos, posteriormente algunos grupos como los lajollanos, se vieron forzados a alejarse de las costas, ya que el nivel oceánico que se fue acrecentando llegaba al punto de lograr invadir sus asentamientos.³⁵⁻⁴⁰

Tabla 1: Relación de algunos genes HLA asociados a distintas poblaciones del mundo. Los yucpas y nukak son tribus amerindias de Sudamérica, pimanos y havasupai son amerindios del suroeste de Estados Unidos y los otomíes, mayos y seris están situados al centro y norte de México.¹⁸⁻³⁴

Locus HLA	Grupos poblacionales																	
	Suizos	Españoles	Askenazi	Libaneses	Chinos	Japoneses	Iraníes	Afro- americ.	Italo- americ.	Hispano- americ.	Yucpas	Nukak	Pimanos	Otomies	Mayos	Seris	Havasupai	
A	02 01:01 03 24	02 01 03 24	26:01	33:01 01:01:01 02:01:01	02:01 02:03 11:01 24:02			30:01	02:01 01:01 03:01	02:01 24:02			02:01 24:02		02 24		02 31 24	
B	07:02 51:01	44 35	38:01	73:01 35:01:01	15:02 35:01 38:02 40:01 46:01			42:01	07:02				48:01 40:05 35:01		35 39 51		48 35 51	
C	07:01 04:01 06:02 07:02		12:03	15:05:01 12:02:02 04:01:01 06:02:01 12:03:01	01:02 04:01			17:01	07:01 07:02 04:01 06:02	04:01 07:01 07:02			08:01 03:04 04:01					
DRB1	07 04 15:01	07 13 04 03	04:02	11:04:01 11:01:01	03:01 04:05 08:03 11:01 12:01 12:02 14:01 14:04 15:02	15:01 15:02 13:02 01:01	03:01 07 11:03	03:02	07:01 03:01 15:01	07:01	04:03 04:11 16:02 14:02	04:04 04:11 16:02 14:02	14:02	04:07 08:02	04:07 14:06	04:07 08:02 14:02		
DQA1	04:01						01:01 01:02 05:01				03:01 05:01	03:01 05:01	05:01				03:011 04:01 05:01	
DQB1	04:02		03:02	03:01:01 05:01:01		06:01 06:04 05:01	02:01 03:01 06:02	04:02			03:01 05:01	03:01 05:01	03:01	03:02 04:02 03:01	03:02 03:01	03:02 04:02 03:01		
DPB1						09:01 04:01 04:02												

Tiempo después hacia el norte y noroeste de la península, hizo su aparición el complejo cultural yumano, desprendido del grupo hokano-siux. Acorde a su historia oral, se originan del Monte Newberry, Oregón E.U. y los primeros descendientes vivieron a lo largo del río Colorado, sin embargo debido a disputas surgidas entre ellos, su paulatino desplazamiento hacia el sur por el grupo shoshoni y las inundaciones provocadas por el río, varios grupos se separaron y migraron extendiéndose hacia el lado suroeste del mismo en las faldas de las montañas Chocolate (al este de lo que era el Lago Cahuilla, ahora Lago Salton CA, E.U.), descendiendo por la formación volcánica *Pilot Knob* (California, E.U.), Baja California o Noroeste de Sonora en México. Adicionalmente, algunos se diseminaron al este del río hacia Yuma, Arizona y noreste hacia La Paz, Arizona. Su presencia al suroeste de E.U. se remonta desde hace 25,000 años, sin embargo, fueron 23,000 años después que arribaron a Baja California asentándose inicialmente en la parte sur de la sierra Juárez (razón por la cual podría considerarse la población yumana kiliwa o pai pai de la actualidad, como la primera de este complejo cultural que se asentó en el territorio). Aunque durante algún tiempo estableció vínculos con el complejo lajollano, e incluso posibilitó su adaptación para vivir en zonas más áridas, este grupo fue el que más arraigo tuvo en Baja California, se diseminó por sus costas, sierras, desierto y valles, tuvo un mayor desarrollo tecnológico y adquirió una identidad territorial más definida. Adicionalmente los yumanos tanto de Estados Unidos como de México, se separaron lingüística y socialmente en grupos más pequeños, derivándose de él por lo menos 15 etnias representadas cada una por lenguas distintas, todas estrechamente vinculadas. Los grupos étnicos que representan a esta familia etnolingüística y que actualmente viven en Baja California son los cucapá (también conocidos como rieños o rianos), los kumiai, los tipai (kumiai del sur o cochimí peninsular), y los pai pai y kiliwas conocidos como serreños (Figura 4).^{35,36,41}.

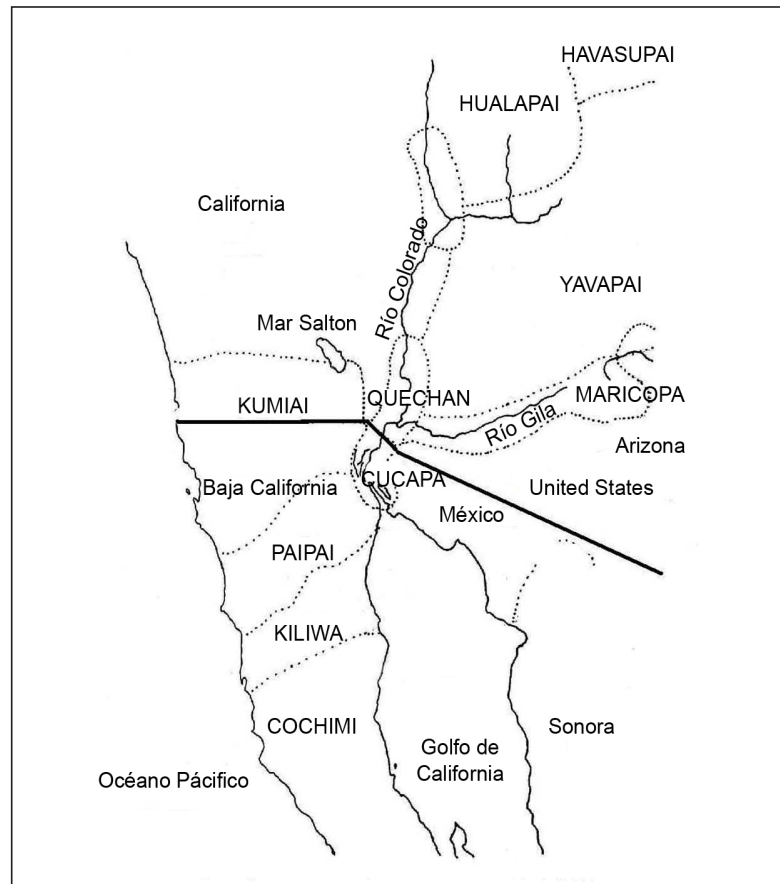


Figura 4. Distribución geográfica de la familia etnolingüística yumana. Alrededor del río Colorado y extendiéndose hacia el Sur, tanto del lado de Estados Unidos como de México, se encuentran asentamientos de estos grupos.

Al momento de la llegada de los españoles a México, en el continente básicamente se identificaban tres regiones caracterizadas acorde al área geográfica y condiciones climatológicas: Mesoamérica, Oasisamérica y Aridamérica, donde en cada una vivían grupos humanos con rasgos culturales particulares. En el caso de Aridamérica, prácticamente comprendía todo el norte, abarcaba la península de Baja California, la costa de California, una parte del centro de Sonora y el norte de Sinaloa, tenía un clima predominantemente desértico y los grupos identificados por los españoles eran los pericú, guaycura

y cochimí (éste último de origen yumano, probablemente era el único de los que ya estaban establecidos al norte, que se lograron conocer). Diversos exploradores españoles emprendieron la búsqueda y dominio del territorio hacia el norte, esto fue sin mucho éxito debido a los ataques de los nativos que se destacaban por su habilidad en la lucha y su carácter independiente. Por ejemplo, en 1539 Francisco de Ulloa entró primero en contacto con los indígenas al norte de la península, en 1540 Hernando de Alarcón exploró el río Colorado introduciéndose por el este de la península, y Juan R. Cabrillo en 1542 llegó al actual puerto de San Diego, CA. E.U.; en cada caso, no hubo oportunidad de contacto con los indígenas ya que éstos últimos no permitían si quiera que los exploradores pisaran tierra. Por otro lado, Sebastián Vizcaíno quien en 1602 llegó también a San Diego, logró establecer un vínculo de comunicación con los nativos kumiai y desarrollar actividades de trueque.^{36,42,43}

La Antigua o Baja California fue ocupada por los españoles propiamente en 1697, y se considera que la población indígena inicial era cercana a los 46,500 individuos (0.3 habitantes por Km²). En aquel momento, los yumanos culturalmente se caracterizaban por un desconocimiento general de la agricultura, sin embargo poseían gran habilidad para la actividad recolectora y pesquera. Adicionalmente se organizaban en *chumuls* o bandas (*rancherías* según le llamaban los españoles) nómadas o seminómadas, cuyos miembros se relacionaban por parentesco, particularmente del lado del padre. Acorde a estos vínculos, se les permitía desplazar ciertas distancias, hasta el límite donde comenzara otra banda. En sus territorios podía encontrarse 400-600 cuevas y abrigos rocosos utilizados como viviendas. El jesuita Eusebio Francisco Kino trabajó en el proyecto misional dentro de la península. Fundó la primera misión (Nuestra Señora de Loreto), y entre 1698 y 1702 realizó una serie de viajes al río Colorado acompañado de yumanos kumiai y cucapá, confirmando con base en la información obtenida, que se encontraba dentro de

una península. Debido a que el propósito misional implicaba la sedentarización de los pueblos indígenas, la adopción forzada de la agricultura, cría de animales y de un sistema gubernamental central jerárquico (todo bajo un ambiente de falta de libertad y respeto por la dignidad), esto orilló a su fracaso en el aspecto social. Aunado a ello, al término del período jesuita quedaban 5,000-14,000 nativos (variación dada acorde a distintos autores), disminución debida en gran medida a la introducción por parte de los españoles, de enfermedades como viruela y sarampión para los cuales los indígenas no tenían inmunidad. Posteriormente, los misioneros franciscanos trataron de darle continuidad a la labor evangelizadora. En 1769 Francisco Junípero Serra fundó la primera misión franciscana (San Diego de Alcalá), sin embargo se decretó que la orden de Santo Domingo tomara su lugar, y los franciscanos administraran territorios más hacia el norte. La primera misión de los dominicos, Nuestra Señora del Rosario, fue fundada en 1774; en 1780 hubo un nuevo descenso en la población indígena causada por epidemia de viruela. El maltrato inhumano hacia los indígenas siguió promoviendo su rebelión, de manera que se registraban periódicamente ataques a las misiones, sobre todo por parte de los yumanos kumiai ^{37-40,44-47}.

En 1823 se instituyó la República de México y 10 años después, se decretó la secularización de las misiones. Se comenzaron a establecer asentamientos de extranjeros descendientes de familias de la Alta California (los Machado, Argüello, Gilbert, Álvarez, Verdugo y Serrano), emparentados con inmigrantes irlandeses e ingleses como los Ames, Crosthwaite, Gilbert y los MaCalleer, de manera que a partir de 1827 comenzaron a poblar el territorio entre Tijuana y San Miguel (al sur), extendiéndose al este a Valle de las Palmas, Tecate y valle de Guadalupe. Para 1890 aparentemente, la población indígena había disminuido a aproximadamente 4,000 habitantes y los nativos continuamente demandaban la propiedad legal de sus tierras. A principios de

los 90's, la población kumiai de San José había ascendido a 90 habitantes, los kumiai de Juntas e Nejí eran 55 ejidatarios, los de San Antonio Necua 144 y los kumiai del Sur o cochimíes de La Huerta constaban de 148 individuos. En 1994, se reportaron 124 habitantes en la comunidad de San José de la Zorra. Algunas de las comunidades ya tenían según dotación parcial por Resolución Presidencial, un área específica de tierras, sin embargo para el caso de la comunidad de San José de la Zorra, no fue sino hasta 1999 que se les entregó oficialmente los planos de limitación, quedando el 22 de agosto establecida un área de 1,752.5 hectáreas. Mediante el Fondo de Apoyo para los Núcleos Agrarios sin Regularizar (FANAR), el ejido kumiai San José de la Zorra en 2011 quedó certificado beneficiando a 34 ejidatarios y con ello, adquirieron seguridad jurídica y patrimonial sobre sus tierras. Para el año siguiente la población de la comunidad había ascendido a 29 mujeres y 44 hombres.⁵⁰ Finalmente, acorde a un según un censo realizado en 2015 (elaboración propia), se identificó un población de 212 mujeres y hombres cuyo rango de edad oscilaba entre 1 y 85 años (Tabla 2).

Tabla 2: Datos demográficos de la comunidad kumiai de San José de la Zorra. A pesar de fenómenos de migración, la tasa de crecimiento en los últimos años ha sido considerable. Se mantiene adicionalmente una mayor proporción de hombres respecto a mujeres. Para el primer año no se reporta la tasa de crecimiento en índice (*) o porcentaje puesto que no se establece un comparativo con el año previo (N/A); para los años 1988, 1991 y 2008, se desconoce la cantidad específica de hombres y mujeres (S/D).⁴⁸⁻⁴⁹

Año	Hombres	Mujeres	Total	Tasa de crecimiento*	% de tasa de crecimiento
1972	42	41	83	N/A	N/A
1978	78	70	148	0.096	9.6
1986	37	31	68	-0.097	-9.7
1988	S/D	S/D	75	0.0489	4.89
1991	S/D	S/D	167	0.400	4.00
2000	82	65	147	0.015	-1.47
2008	S/D	S/D	84	-0.279	-2.79
2012	44	29	73	-0.070	-7.01
2015	113	99	212	1.459	145.2

2.3.2 Ubicación y clima

La comunidad de San José de la Zorra se ubica en el municipio de Ensenada, 12 millas noroeste del Valle de Guadalupe, en la Entidad de Baja California. Entre las coordenadas 32°10'47'' latitud norte y 116°41'04'' longitud oeste, a 250-335 metros sobre el nivel del mar (msnm) de altitud, su núcleo agrario comprende 1,750.664348 hectáreas en total. Se encuentra inmerso en un clima mediterráneo, templado.^{50,51}

2.3.3 Legua

Durante mucho tiempo, las lenguas prehistóricas de la península de Baja California se agruparon en tres regiones: la del norte llamada yumana, la del centro denominada cochimí y la del sur, donde se localizaron los guaicurianos. La clasificación y relación entre distintas lenguas yumanas y su relación entre la cochimí depende del autor y puede ser variable. Para efectos de este escrito, se considerará la cochimí laymón o cochimí propiamente dicho, como una lengua extinta y se diferenciará del cochimí moderno que en la actualidad se utiliza en algunas comunidades del norte de la península, considerándose un dialecto de la lengua kumiai. En 1978 se demostró una asociación entre los ahora llamados cochimí y los yumanos, razón por la cual se consideran dentro de la misma familia lingüística, a la cual además pertenecen el pai pai, kiliwa, cucapáh, mojave, maricopa, quechan, yavapai, havasupai y hualapai. Dicha familia yumana forma parte de la superfamilia lingüística hokano-siux.^{36-40,54}

Como se mencionó previamente, acorde a diferencias entre autores, la identificación entre sí o como se denominan comunal o localmente los grupos indígenas, los nombres que reciben pueden ser variables. Incluso el nombre que en su momento les asignaron los españoles, en virtud de la misión que se

encontraba más cercanamente a ellos, influyó para dicha identificación. De esta manera, aún siendo que la nación kumiai se encuentra en ambos lados de la frontera, tanto en México como en Estados Unidos, muchos de los indígenas al norte de la frontera son identificados como diegueños. Adicionalmente el término cochimí ahora utilizado, puede tener origen en la forma en que los misioneros designaban como "cochimí del norte" a los yumanos que vivían al norte de los cochimí peninsulares que vivían en el desierto central. Como consecuencia, los indígenas que viven en la comunidad de la Huerta y San Antonio Necua se han seguido identificando con el nombre utilizado para los indios que se observaban desde la misión de San Borja o Santa Gertrudis.³⁶⁻⁴⁰

El término "kumiyai" significa "alto", además de "costa", y en ocasiones se asocia con el término "tipai" (oeste) para identificar a los kumiai o diegueños del sur, es decir, los que viven al sur de la frontera como aquellos de la comunidad de San José de la Zorra. En referencia a quienes viven más al sur de éstos (como los de La Huerta), el término también utilizado entre ellos sería "tipai kuwak", siendo "kuwak" una palabra alusiva a "sur".^{37-40,54}

2.3.4 Antecedentes de estudios epidemiológicos

Su percepción de salud se ha visto influenciada por las creencias derivadas de la cultura yumana, lo que implica el uso de medicina tradicional, así como la consideración del origen de la enfermedad por cuestiones sobrenaturales. El proceso de aculturación a la cual se han sometido ha promovido el uso de la medicina moderna, y la comprensión del desarrollo de enfermedades como sarampión, tuberculosis o cáncer traídas inicialmente por los grupos de colonizadores europeos, o de padecimientos como gonorrea y tosferina cuyos contagios en la época postmisional, eran debido a su desplazamiento en búsqueda de trabajo, a poblados no indígenas como la ciudad de Mexicali.³⁶

Los estudios realizados en este rubro han sido limitados. Existe información que indica que en 1985 se le ofrecía con cierta periodicidad, atención en salud a las distintas comunidades de manera directa a través del Instituto Nacional Indigenista (INI). Con base en esto se posibilitó la generación de un esquema de morbilidad y registro de porcentajes de natalidad y mortalidad (Véase tabla 3). Se detectaron las enfermedades con más ocurrencia en el momento entre las que se destacaban hipertensión, diabetes y dolores reumáticos. Adicionalmente, se hizo evidente, la falta de atención hacia la quinta parte de la población indígena general, por la falta de recursos para traslado hacia los centros de salud, para el pago de consultas o de los medicamentos necesarios. Incluso más de una cuarta parte de su población infantil no se había sometido al esquema de inmunización correspondiente.⁴⁸

En 1996 se realizó otro estudio en torno al abastecimiento y calidad del agua en cinco comunidades indígenas. Uno de los pozos de San José de la Zorra, mostró ser el más contaminado presuntamente debido a las áreas sépticas cercanas, residuos de estiércol de ganado filtrado en la capa freática, además de la falta de cubiertas en sus pozos. Esto dio pie tres años después a una investigación en salud pública en la comunidad kumiai de San Antonio Necua. En dicha investigación, dirigida por la Universidad del Estado de San Diego (SDSU) y con colaboración del Instituto de Culturas Nativas de Baja California (CUNA), participaron 112 individuos, distribuidos en 29 familias durante cuatro semanas. Consistió en la recaudación de información sociodemográfica, antecedentes fisiopatológicos, hábitos de higiene, hábitos de consumo, distribución y almacenamiento de agua así como un registro de signos y síntomas asociados al desarrollo de enfermedades gastrointestinales en el transcurso de ese tiempo. Los resultados revelaron una incidencia de 446 casos de enfermedades gastrointestinales por cada 1000 individuos. Indicios de parasitosis y contaminación con bacterias coliformes fecales que sobrepasaban

el límite establecido por cada cien mililitros de agua que consumían. Acorde a los signos y síntomas referidos por los pacientes, la presencia de roedores en las viviendas y los reportes de laboratorio, se confirmó la asociación entre las afecciones gastrointestinales (presentadas con mayor frecuencia respecto a otros tipos de afecciones registradas) y la condición de calidad del agua.⁵⁶

Tabla 3: Enfermedades reportadas de mayor incidencia. Prevalecen a lo largo del año afecciones crónico-degenerativas, así como infecciones a nivel gastrointestinal.

Enfermedades más frecuentes		Causas	Épocas
En general	Rinofaringitis	Factores climatológicos y desequilibrio agente-huésped	Otoño-invierno
	Amigdalitis	Factores climatológicos y desequilibrio agente-huésped	Otoño-invierno
	Amebiasis	Fecalismo al aire libre y enfermos asintomáticos transmisores	Todo el año, pero más frecuente en primavera-verano
	Gastroenteritis por infección	Malos hábitos higiénicos y dietéticos	Todo el año, pero más frecuente en primavera-verano
	Anemia	Alimentación mal equilibrada, hábitos tradicionales de alimentación y falta de recursos	Todo el año
	Caries dental	Malos hábitos higiénicos	Todo el año
	Traumatismos y/o accidentes	Accidentes de trabajo y descuidos personales	Todo el año
	Conjuntivitis	Infecciones adquiridas	Todo el año, pero más frecuente en primavera-verano
	Dermatitis	Infecciones transmitidas y malos hábitos de higiene	Todo el año
	Reumatismo	Factores climatológicos y desequilibrio agente-huésped	Todo el año, pero más frecuente otoño-invierno
Crónicas	Hipertensión	La padecen personas adultas con antecedentes familiares	Todo el año
	Diabetes	Personas con antecedes	Todo el año

	mellitus	heredo familiares presentes	
	Enfermedades cardiovasculares	La padecen personas adultas con antecedentes de cardiopatías	Todo el año
	Tuberculosis pulmonar	Enfermedad adquirida en la región	Todo el año
	Cáncer de mama	Cuenta con antecedentes familiares	De hace 1 año

En 2004, la Universidad del Estado de San Diego analizó el grado de aculturación de algunas comunidades indígenas, basados en gran medida en su percepción de enfermedad y sanación. Para ello, participaron 313 mujeres mayores de 18 años, 37 de ellas pertenecientes a San José de la Zorra y se realizó un registro de sus antecedentes fisiopatológicos, algunas costumbres, ideas y conocimientos en torno al cuidado de salud. Esto permitió identificar la enfermedades con mayor incidencia en adultos, lo que en el caso específico de San José de la Zorra, involucraban diabetes, gripe y diarrea. En relación a enfermedades de la niñez, gripe, "empacho" y diarrea fueron las reportadas con mayor frecuencia.⁵⁴

CAPÍTULO III. MÉTODO

3.1. Diseño de investigación

Se trató de un estudio descriptivo, transversal. Esto es considerando que se limitó a observar, medir y analizar ciertas variables para valorar la relación de los parámetros genéticos, fisiopatológicos y sociodemográficos con el estado de salud de los individuos. Adicionalmente, se obtuvieron datos que permitieron generar una caracterización a nivel molecular en un solo momento de análisis.⁵⁷

3.2. Muestreo y sujetos

A través de un muestreo por conveniencia, se analizaron 35 adultos, niños y jóvenes de ambos sexos, pertenecientes a la comunidad de San José de la Zorra que se encuentra en el Ejido "El Porvenir". Éste forma parte del municipio de Ensenada, en el estado de Baja California, México. Se caracterizaron a los sujetos para generar la tipificación HLA de manera individual, sin embargo se distribuyeron en 12 familias, para la comparación de las frecuencias haplotípicas. Cada familia abarcó un máximo de dos generaciones (familia nuclear) y los individuos sin familiares directos, fueron considerados con una familia separada.

Como criterios de inclusión se consideraron a) Todos los sujetos poseedores de un componente kumiai, es decir, que por lo menos uno de sus padres o abuelos fuesen nativos de esta etnia indígena, b) De cualquier edad, c) Cualquier sexo, d) Personas que de manera voluntaria hayan aceptado formar parte del proceso y hayan firmado el consentimiento informado correspondiente.

Se excluyeron a a) Individuos no pertenecientes a la comunidad de San José de la Zorra, b) Individuos que no hayan nacido ahí, c) Personas que no vivieran en las rancherías aledañas o en la ciudad de Ensenada.

3.3 Ámbito de estudio

La colecta de datos que implicaban las historias clínicas así como la obtención de las muestras, se realizó directamente en la comunidad de San José de la Zorra, municipio de Ensenada, Baja California.

La separación de leucocitos, la extracción de ADN genómico, la amplificación de genes HLA y la tipificación de los mismos, se desarrolló en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, en la ciudad de México, D.F.

Los estudios de hematología, serología y exámenes generales de orina, se desarrollaron en la Facultad de Medicina y Psicología, de la Universidad Autónoma de Baja California.

Los análisis bioinformáticos se realizaron tanto en Instituto Nacional de Medicina Genómica, en la Ciudad de México, como en la Facultad de Medicina y Psicología, de la Universidad Autónoma de Baja California, México.

3.4 Variables de estudio

Variables dependientes

Tipo de gen HLA (en su variante de clase I y clase II).

Variable independiente

Presencia del componente kumiai

Variables sociodemográficas

Sexo, edad, género, estado civil, dominio del idioma, escolaridad, ocupación, hábitos.

3.5. Materiales

3.5.1 Equipos de reacciones

- *Maxwell 16 Blood DNA purification kit*, marca Promega
- *Quant-iT™ dsDNA High Sensitivity assay kit*
- *TruSight™ HLA Sequencing panel library prep kit* de Illumina
- *MiSeq Reagent kit v2 (500 cycles)* de Illumina
- Nextera XT Index kit v2 set A (96 índices)
- Nextera XT Index kit v2 set B (96 índices)

3.5.2 Otros reactivos

- Glucosa oxidasa marca Pointe Scientific
- Solución salina
- Anticuerpos monoclonales anti-A, anti-B y anti-D Transclone® marca Biorad
- Agua grado biología molecular
- Agarosa al 1% en TAE
- Amortiguador TAE 1%

- Amortiguador de cargado BlueJuice^œ™
- Colorante para geles de ácidos nucleicos SYBR®Gold
- Etanol al 80%
- Tris-HCl 10 mM, pH 8.5
- NaOH 2 N
- PhiX 10 nM
- Tween 20
- Tiras reactivas Multistix® marca Siemens

3.5.3 Instrumentos

- Mindray B5-200
- Centrífuga VWR modelo Clinical 50
- Agitador LW Scientific modelo LW100
- Mindray BC-3200
- Procesador magnético de partículas Maxwell®16 de Promega
- Sistema de electroforesis Wide Mini-Sub Cell GT marca Biorad
- Fuente de poder Power Pac™ Basic Power Supply marca Biorad
- Sistema documentador de geles Gel Doc XR marca Biorad
- Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies Inc.
- Fluorómetro Qubit™ 2.0 de Invitrogen
- Agitador vortex Thermolyne Maxi Mix II marca Daigger
- Termociclador PCR System 9700 marca Applied Biosystems
- Centrífuga Allegra™ 25R de Beckman Coulter
- Agitador de microplacas de alta velocidad, marca Illumina
- Secuenciador MiSeq v2 de Illumina
- Microscopio óptico Zeiss, Axiostar plus
- Centrífuga Damon/IEC Division modelo HN-S

3.5.4 Apoyo computacional

- Microsoft Excel v14.07159.5000
- Software de análisis de TruSight HLA, Conexio Assign v2.0

3.6 Estrategia metodológica

Se realizó primeramente la labor de campo, que implicaba dar a conocer el proyecto de investigación entre los miembros de la comunidad para identificar quienes querían participar en él. Esto implicó contactarse con el comisariado de la comunidad, la responsable del área de salud de la misma, un miembro de una comunidad indígena que coordina una sociedad civil regional a favor del cuidado, protección y difusión de las etnias y cada uno de los individuos de la comunidad elegida. Casa por casa se desarrolló el contacto con los miembros de la comunidad, en ocasiones en más de una vez por familia para explicarles el propósito del estudio e invitarlos a acceder a formar parte de la investigación. Estudiantes de la Facultad de Odontología, así como de la Facultad de Medicina y Psicología apoyaron en el desarrollo de las encuestas. Personal de la Facultad de Medicina y Psicología, así como del Instituto Mexicano del Seguro Social hicieron las tomas pertinentes de sangre total a aquellos individuos que aceptaron participar en el estudio. Parte de la muestra fue utilizada para realizar los estudios serológicos y hematológicos, y la otra parte se utilizó para la extracción de leucocitos y pruebas moleculares. Éstas últimas se hicieron con base en esto se realizó a través de la tecnología de secuenciación masiva en paralelo, la secuencia de los 8-11 genes HLA para cada uno de los individuos. Después a través del software *Assign*, se realizaron las tipificaciones de los genes secuenciados. Finalmente, con el análisis de los

resultados bioinformáticos y de las encuestas realizadas, se obtuvieron conclusiones en torno a la información recaudada.

3.7. Procedimientos

3.7.1 Tratamiento de la muestra

Además del torniquete y el correspondiente material de desinfección y curación utilizado en toda flebotomía, los materiales utilizados fueron agujas BD Vacutainer® de 21Gx1.5" o 22Gx1" y 2 tubos BD Vacutainer® de 4 mL con anticoagulante EDTAK₂ para cada individuo en estudio, cuyos parámetros hematológicos y/o genéticos se determinaron. En el caso de los individuos a quienes se realizaron adicionalmente estudios serológicos, las condiciones incluyeron un ayuno de aproximadamente 8 horas permitiendo el consumo líquido exclusivamente de agua, y además de los tubos con anticoagulante, se colectaron otros 3-5 mL en tubos BD Vacutainer® sin anticoagulante.

Se centrifugaron aproximadamente 4 mL de sangre total de cada individuo a 2000 x g durante 20 minutos. Posteriormente se separó el *buffy coat* con una micropipeta y se transfirió cada capa leucocitaria a los contenedores del cartucho de extracción Maxwell.

3.7.2 Estudios serológicos

Los sueros de los tubos sin anticoagulante fueron separados mediante una centrífuga marca VWR, modelo Clinical 50. La centrifugación fue realizada durante 10 minutos a 3000 rpm. Posteriormente se procesaron los sueros para la determinación cuantitativa de glucosa. Se utilizó la técnica de glucosa oxidasa y el reactivo correspondiente de la casa comercial *Pointe Scientific*, para obtener las lecturas a 500 nm de longitud de onda en un analizador químico automatizado *Mindray B5-200*.

3.7.3 Estudios hematológicos

Se utilizó una muestra de sangre total para desarrollar biometrías hemáticas y la tipificación de grupos sanguíneos. Posterior a su homogenización en un agitador LW *Scientific* modelo LW100, las muestras se procesaron en un *Mindray* BC-3200 para la diferenciación de poblaciones celulares y análisis de 19 parámetros distintos. Los grupos sanguíneos fueron determinados a través de reacciones de aglutinación con anticuerpos monoclonales de ratón *Transclone*® de la marca BioRad. Se hicieron diluciones 1:1 de 200 µL de sangre total en solución salina y en una placa de vidrio marca *American Scientific Products* se colocó una gota de la dilución y una gota de uno de los antisueros, se mezcló con un palillo de madera y realizó agitación orbital manual durante 1-2 minutos. Se efectuó una reacción por cada antisuero (anti-A, anti-B y anti-D), por cada individuo analizado.⁵⁸

3.7.4 Estudios moleculares

En la figura 5 se muestra el diagrama de flujo exclusivamente para lo que implica la labor de secuenciación masiva, por lote de muestras analizadas.

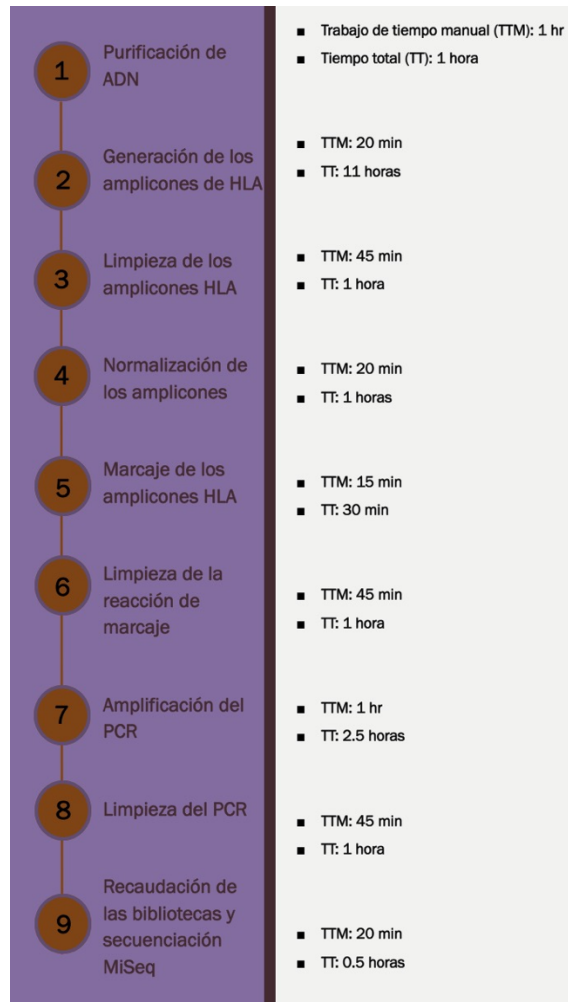


Figura 5. Diagrama de flujo para el uso de panel de secuenciación. El panel "TruSight HLA" describe 9 pasos para la preparación de bibliotecas, que implica un proceso de aproximadamente 19.5 horas, adicionales a lo que se requiere para obtener la muestra de manera pura, realizar y analizar la tipificación.

3.7.4.1 Aislamiento de ADN

El sistema Maxwell® 16 permite la purificación de ADN a partir de 300 μL de sangre (asumiendo un promedio de 4.2×10^6 a 1.2×10^7 leucocitos/mL) colectada en tubos tratados con EDTA, heparina o citrato, o bien, 250 μL de capa leucocitaria (obtenida de 2.5 mL de sangre total). El proceso se hace de manera automatizada, con el procesador magnético de partículas Maxwell® 16.

Encendido el aparato, se efectuaron algunas autocomprobaciones y se colocaron sus piezas en la posición de inicio. Se seleccionó "capa leucocitaria" en la pantalla de protocolos para elegir el método y "Run/Stop" para continuar. Posteriormente se transfirieron los cartuchos del kit de extracción en el instrumento, con el lado estriado del cartucho más cercano a la puerta y presionando hacia abajo en su parte posterior hasta encajarlo completamente. Se colocó un tubo de elución azul por cada cartucho en las ranuras para tubos de elución que hay en la plataforma y se añadieron 300 μ L de tampón de elución a cada tubo de elución correspondiente. Finalmente se pulsó el botón "Run/Stop" para permitir la retracción de la plataforma y cerrado de la puerta; la purificación inicia de manera inmediata mostrando el tiempo restante de la misma. Finalizado el proceso, se siguieron las instrucciones de la pantalla para abrir la puerta y comprobar la posición de los émbolos en el pocillo número 7 del cartucho al final de la ejecución. Se pulsó "Run/Stop" para extender la plataforma hacia afuera y retirar los tubos de elución de las ranuras térmicas. Se colocaron en la gradilla de tubos de elución magnética y transfirieron a tubos eppendorf estériles de 1.5 μ L, aspirando con micropipeta y separándolas de las partículas capturadas en tubo de elución⁵⁹.

3.7.4.2 Integridad del ADN genómico

Para poder amplificar los genes en cuestión, fue necesario revisar la integridad de los fragmentos obtenidos de la purificación. Esto se hizo a través del corrido de las muestras por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La preparación del gel se logró agregando 1 g de agarosa a 100 ml de TAE 1X. Posteriormente se calentó en horno de microondas hasta que quedara completamente disuelto y se vertió en el molde correspondiente para hacer el gel, colocando encima el peine para la generación de pocillos. Mientras el gel se solidificaba, se prepararon las muestras de ADN, tomando 5 μ L de la

muestra y mezclándolo con 4 μL del colorante *BlueJuice-Sybergold* (Dilución 1:1000 de SYBR *Gold* en *BlueJuice*), en un tubo de 0.2 mL. Teniendo el gel haya solidificado, se retiró el peine y se colocó en la cámara de electroforesis asegurando que los orificios para colocar la muestra se encontraran a la altura del cátodo (electrodo negro). Se cubrió el gel con el buffer de electroforesis de forma que quede todo cubierto por la solución y se cargaron las muestras utilizando micropipetas. Posteriormente se colocó la tapadera de la cámara en su lugar y los electrodos a la fuente de poder, el ánodo con el ánodo (rojo con rojo) y cátodo con cátodo (negro-negro), asegurando de que ambas puntas eléctricas estuviesen conectadas al mismo canal de la fuente de poder. La electroforesis se realizó a 120 volts durante 30 min. Terminada la corrida, se apagó la fuente de poder, desconectaron los electrodos de las entradas y removi6 la tapa de la cámara. Se retir6 el gel de la cámara y visualizó en el transiluminador, apreciándose las bandas color rosa fluorescente de las muestras analizadas.

3.7.4.3. Cuantificación en NanoDrop 1000

De manera inicial se cuantificaron los fragmentos en *Nanodrop*. Éste es un instrumento que permite la medición de muestras en el rango de 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ a 3700 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN de doble cadena utilizando tecnología de fibra óptica y tensión superficial⁹⁰. El proceso de cuantificación implicó la limpieza de la superficie óptica superior e inferior del sistema de retención de muestra del microespectrofotómetro, utilizando 1-2 μL de agua destilada, bajando el brazo del instrumento y tocando varias veces la superficie óptica inferior con la superior para impregnarla con el agua. Posteriormente se abrió el software *Nanodrop* y se seleccionó el modo de ácidos nucleicos; se inicializó el instrumento colocando 1 μL de agua destilada, bajando el brazo y seleccionando "inicializar" en el software. Después, se esperó

aproximadamente 10 segundos y se limpiaron con toallas *Kimwipes* las dos superficies ópticas. Posteriormente se realizó la medición blanco cargando 1 μL de agua destilada y se seleccionó "blanco". Sucedió esto, se limpiaron las dos superficies con una toalla. El propósito del agua es fungir como blanco para sustraer la lectura dada por la misma, a las mediciones de las muestras. Después se hicieron las mediciones del ácido nucleico a 260 nm de absorbancia, cargando 1.5 μL de la muestra correspondiente y seleccionando "medir"; una vez completada la medición, se limpiaron las dos superficies con una toalla. Finalmente se levantó el brazo y se limpió con toallas las dos superficies. La limpieza con agua destilada también se desarrolla al final de todas las cuantificaciones de ADN, sin embargo entre mediciones sólo se requiere el uso de las toallas para eliminar lo que se impregne en las superficies ópticas. Hechas las cuantificaciones iniciales, se procedió a preparar diluciones de 50 μL a 20 ng/ μL en agua.

3.7.4.4 Cuantificación con el fluorómetro Qubit 2.0

El protocolo seguido con este instrumento permite una cuantificación más sensible del ácido nucleico a través de la tinción selectiva de ADN de doble cadena. El uso de tubos claros de 0.5 mL de pared delgada, es trascendente para lograr la lectura cuando la muestra se excita a 502 nm, teniendo un rango detectable de 2 a 1000 ng de ADN⁶¹. Después del atemperado de los reactivos, se rotularon los tubos de las muestras y los dos estándares para su identificación. La solución de trabajo Quant-iT™ dsDNA HS se preparó diluyendo el reactivo Quant-iT™ dsDNA HS en el buffer Quant-iT™ dsDNA HS, en proporción 1:200, posteriormente se prepararon los estándares y muestras como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Preparación de muestras y estándares para su cuantificación por fluorometría; el estándar 1 se prepara diluyendo 10 μL del estándar a 0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y el estándar 2, diluyendo 10 μL del estándar que está a 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Volúmenes	Tubos con estándares	Tubos con muestras
De la solución de trabajo	190 μL	180-199 μL
De cada estándar	10 μL	---
De la muestra	---	1-20 μL
Total en cada tubo	200 μL	200 μL

Los reactivos se mezclaron con un agitador vórtex *Gennie 2*, marca *Daigger* durante 2-3 minutos y posteriormente se incubaron por 2 minutos a temperatura ambiente (la señal de fluorescencia es estable hasta 3 horas posterior a la incubación, a temperatura ambiente). El fluorómetro se calibró acorde a las indicaciones de su manual, utilizando los estándares 1 y 2. En primera instancia se seleccionó en la pantalla inicial del instrumento el tipo de ensayo (ADN); después de desplegadas las opciones para leer nuevos estándares o bien seleccionar una previa calibración, se dio click en "yes" para desarrollar una nueva calibración. El instrumento solicita inmediatamente después la inserción del tubo con el estándar 1, por lo que se colocó éste y dio click en "read" para generar la lectura (lo que dura aproximadamente 3 segundos). Posteriormente se insertó el estándar 2, solicitó la lectura y esperó confirmar la visualización de una línea recta en una gráfica de fluorescencia vs concentración entre los rangos de 00-500 ng/mL (los puntos inicial y final corresponden a las lecturas de los estándares). Después se da click en "no" cuando el instrumento pregunta si se dará lectura a nuevos estándares, y en "sample", lo que lleva al despliegue de la pantalla de lectura de muestras. Finalmente se introdujo el tubo con la primera muestra (se ajustan las unidades de concentración en caso necesario) y da click en "read", se esperaron 3 segundos y presionó "read next sample" para preparar la siguiente lectura. Esto se hace cuantas veces sea necesario, para leer todas las muestras disponibles.

A partir de la concentración determinada por el Qubit, se prepararon 50 μL de las muestras a 10 ng/ μL .

3.7.4.5 Secuenciación de siguiente generación (NGS)

El principio de la metodología se basa en la incorporación de **dNTP's** por la ADN polimeras, a una hebra del ADN templado durante ciclos secuenciales de amplificación de ADN. Durante cada ciclo, en el sitio de incorporación lo nucleótidos son identificados por excitación de un fluoróforo. La diferencia principal estriba en que, en lugar de secuenciar un solo fragmento de ADN, la NGS desarrolla este proceso con millones de fragmentos de una manera masiva en paralelo. Existen diversas plataformas para hacer esto posible, sin embargo para efectos de este estudio se utilizó la de *Illumina*, que es la más adoptada en la industria, más certera, brinda el mayor rendimiento libre de errores de lectura y el mayor porcentaje de llamados arriba de Q30 (un parámetro que estima la proporción de errores). El protocolo general incluye cuatro pasos básicos: la preparación de la biblioteca, la generación de aglomerados o *clusters*, la secuenciación y el análisis de datos^{62, 63}.

La biblioteca se prepara por fragmentación al azar de la muestra de ADN, seguida por una ligación de adaptadores en los extremos 5' y 3'. De manera alternativa, el marcaje (tagmentación), puede combinar las reacciones de fragmentación y ligación en un solo paso que incrementa considerablemente la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca. Posteriormente se amplifican a través de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), los fragmentos que tienen los adaptadores y se purifican. Para la generación de aglomerados, se necesita cargar la biblioteca en la celda de flujo, para que los fragmentos se capturen por oligonucleótidos complementarios a los adaptadores, unidos a la superficie de la celda; ésta última tiene una superficie

diseñada para que las enzimas utilizadas puedan acceder fácilmente a los fragmentos, existe una buena estabilidad del templado unido a la superficie y se presenta poca unión inespecífica a los nucleótidos marcados con fluorescencia. Posteriormente, cada fragmento sufre una amplificación en puente y se generan aglomerados (decenas de millones), siendo de igual secuencia los fragmentos que generan los aglomerados, pero distinta entre aglomerado y aglomerado.

La tecnología de secuenciación basada en síntesis de *Illumina*, utiliza un método basado en un terminador reversible que detecta bases individuales mientras son incorporadas en las hebras del ADN templado. En cada ciclo sólo un dNTP marcado se agrega a la cadena de ADN, lo que sirve como terminador para la polimerización, así, después de la incorporación de cada dNTP, el colorante fluorescente permite a través de una imagen la identificación de la base y después se rompe enzimáticamente para permitir la incorporación del siguiente nucleótido. A medida que se van haciendo presentes los cuatro tipos de dNTP's en cada ciclo de secuenciación, comienza una competencia natural que minimiza la incorporación de un sesgo y reduce las tasas de error comparado con otras tecnologías. Como resultado se tiene una secuenciación certera que prácticamente elimina los errores relacionados con el contexto en el que se desarrolla la secuencia, incluso dentro de regiones de secuencias repetitivas y homopolímeros.

La plataforma se basa en la lectura paralela de una gran cantidad de secuencias. Se utiliza una cobertura uniforme para generar secuencias consenso y asegurar una determinación eficaz de las diferencias genéticas. Durante el análisis de datos y el alineamiento, las lecturas de las secuencias identificadas son alineadas contra un genoma de referencia y es posible desarrollar posteriormente más ensayos bioinformáticos.

Generación de los amplicones HLA, por PCR

Se utilizaron dos programas diferentes en el termociclador, un programa para amplificar los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1/3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DPA1, HLA-DPB1 y otro para el gen HLA-DQB1. Las condiciones correspondientes se pueden apreciar en la tabla 5.

Tabla 5: Condiciones de amplificación de genes HLA. Del lado izquierdo se describen aquellas para los de clase I, cuyos amplicones tienen un tamaño aproximado de 546 pb (exones 2 y 3) y del lado derecho los de clase II, cuyos tamaños de amplicones son de aproximadamente 270 pb (exon 2).

Genes	Parámetros utilizados *		
	Tiempo	Temperatura	Ciclos
HLA-A, HLA-B HLA-C HLA-DRB1/3/4/5 HLA-DQA1 HLA-DPA1 HLA-DPB1	3 min	94 °C	35
	30 seg	94 °C	
	2 min	60 °C	
	15 min	68 °C	
	10 min	68 °C	
	Hold	10 °C	
HLA-DQB1	3 min	94 °C	10
	30 seg	94 °C	
	2 min	55 °C	
	15 min	72 °C	
	30 seg	94 °C	25
	2 min	60 °C	
	15 min	72 °C	
	10 min	68 °C	
Hold	10 °C		

Para la preparación de los tubos de reacción de PCR, se utilizaron dos tiras de tubos por cada muestra (para colocar una tira en el termociclador donde

se amplificó HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1/3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DPA1, HLA-DPB1 y la otra tira en el termociclador donde se amplificó HLA-DQB1). Se colocaron 5 μ L de cada muestra en 7 tubos (uno por cada locus) de una tira de manera vertical y 5 μ L en otra tira (para el octavo locus, HLA-DQB1). Suponiendo que tenemos las tiras colocadas en placas como las que se aprecian en la figura 6, el sentido en el cual se colocarían 5 muestras, sería tal como se indica por las flechas.

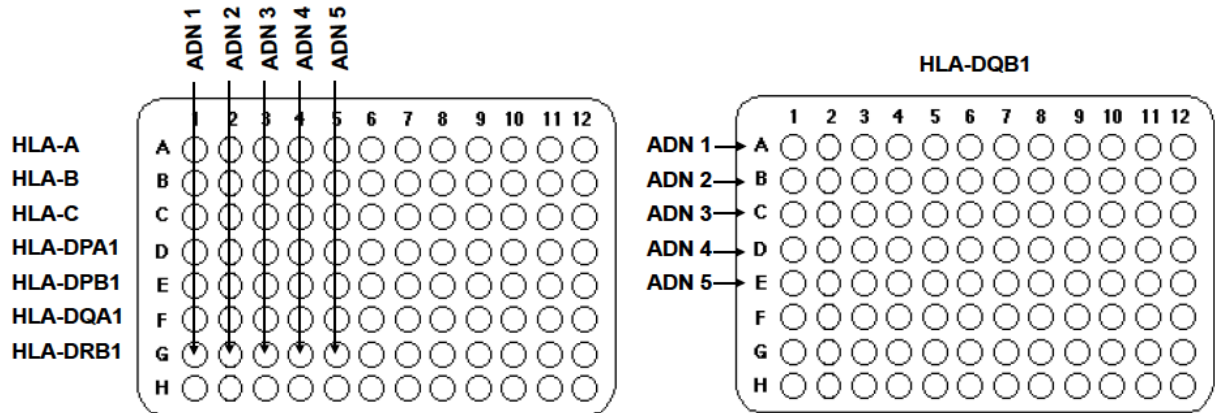


Figura 6. Posición de las muestras para el desarrollo de las reacciones de PCR

Se generó una mezcla maestra (master mix) compuesta por 25 μ L del reactivo HMP (*HLA PCR Mix*), 2 de ADN polimerasa *Master Amp Extra-Long* y 13 de agua grado biología molecular del kit *TruSight HLA Sequencing Panel*, esto para cada reacción de PCR. Posteriormente se colocaron 40 μ L de la mezcla en cada tubo de reacción que ya tenía la muestra y se mezcló por pipeteo. Se centrifugaron a 280 x g durante 2 minutos, se colocaron en los termocicladores correspondientes y se corrieron según lo programado. Después de terminada la PCR, se centrifugaron los tubos a 280 x g durante 2 minutos y

se transfirieron los productos de PCR en placas MIDI etiquetadas como LRC (*long range clean up*). Se colocó el producto de DQB1 de cada muestra en el último pozo de cada columna (pozo H). En este punto de la metodología es posible almacenar las reacciones hasta 7 días, a una temperatura en el rango de -25°C a -15°C) o bien, proceder inmediatamente con el protocolo.

Purificación de los productos de PCR

Se añadieron 45 µL de las SPB (*Sample Purification Beads*) a cada pozo con el que se estaba trabajando, se selló la placa y agitó a 1800 rpm, durante 2 minutos en un agitador de microplacas de alta velocidad, marca *Illumina*. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se removió el sello de la placa y se colocó sobre un imán (adaptado para dichas placas) hasta observar que el líquido estuviera claro (aproximadamente 2 minutos). Se descartó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta, se agregaron 200 µL de etanol al 80% y se incubó durante 30 segundos. Después se volvió a remover el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol. Se eliminó el etanol residual y se dejó secar por 5 minutos. Se quitó la placa del imán, añadieron 30 µL de RSB (*Resuspension Buffer*), selló la placa y se volvió a agitar a 1800 rpm durante 2 minutos. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos para liberar el ADN de las perlas, se removió el sello de la placa, se colocó en el imán y se esperó a que el líquido estuviese claro (2 minutos). Se transfirieron 20 µL del sobrenadante de las columnas LRC a unas columnas etiquetadas como LRB (*Long Range Bead Based Normalization 2*) de la placa MDI (o bien de ser necesario, una placa diferente marcada como LRB, por la disponibilidad de pocillos). En este punto del protocolo es posible almacenar la placa sellada hasta por 7 días en un rango de -25°C a -15°C, o bien continuar con el proceso. Adicionalmente, antes de continuar con el siguiente paso, es necesario verificar

los amplificadores por electroforesis como se menciona en el apartado III.7.3.3 "Integridad del ADN genómico", tomando 5 μL de cada producto de PCR, mezclándolo con 4 μL del colorante *BlueJuice-SYBR Gold* y cargándolos en un gel de agarosa al 1%.

Normalización de los productos de PCR

El primer paso consistió en preparar las perlas de trabajo. Se resuspendió por pipeteo el LNB1 (*Library Normalization Beads 1*) y se transfirieron 8.3^n μL de éstas al tubo que contienen 45.8ⁿ μL de LNA1 (*Library Normalization Additives 1*), se mezcló por inversión. Se añadieron 45 μL de la mezcla a cada pozo de las columnas LRB. Se selló la placa y agitó a 1800 rpm durante 30 minutos. Después se quitó el sello de la placa y colocó sobre el imán hasta que el líquido estuviese claro (2 minutos). Se descartó con una micropipeta el sobrenadante y se añadieron 45 μL de RSB. Posteriormente se selló y agitó la placa a 1800 rpm durante 5 minutos, se removió el sello de la placa y colocó sobre el imán hasta que el líquido estuviese claro (2 minutos). Se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Se añadieron 40 μL de HTB (*HLA Tagmentation Buffer*) sobre el pellet de perlas, selló y agitó la placa a 1800 rpm durante 5 minutos. Se procedió inmediatamente después al siguiente paso. Nota: "n" es la cantidad de pocillos que se están preparando para normalizar. De manera que si por ejemplo tuviésemos la placa completa trabajando, necesitaríamos una mezcla de 4.4 mL de LNA1 con 800 μL de LNAB1.

Tagmentación de los amplicones HLA

Se calentó un termociclador a 58°C y se marcó una placa de PCR como TAG. Se transfirieron 40 μL de la placa LRB a la placa TAG (por muestra, por locus). Después se añadieron 10 μL /pozo de HTM (*HLA Tagmentation Mix*) a la

placa TAG, se mezcló 1 min a 1600 rpm y se selló. Posteriormente se colocó en el termociclador por 12 minutos y al terminar el tiempo se quitó el sello y colocó sobre el imán hasta que el líquido estuviese claro (2 minutos). Finalmente se transfirió todo el sobrenadante de la reacción de tagmentación a las columnas etiquetadas como NTC (*Nextera Tagmentation Clean Up*) de una placa MIDI y se procedió inmediatamente al siguiente paso.

Purificación de la reacción de tagmentación

Primeramente se marcó una placa de PCR con el nombre NPP1 (*Nextera PCR Plate 1*). Se procedió a añadir 25 μ L de SPB a las columnas NTC, se sellaron y agitaron a 1800 rpm durante 5 minutos. Después se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, se quitó el sello de la placa, colocó en el imán y esperó hasta que el líquido estuviese claro (2 minutos). Posteriormente se descartó el sobrenadante y agregaron 200 μ L de etanol al 80%, se incubó 30 segundos y descartó el sobrenadante. Se repitió el lavado con etanol y sin quitar la placa del imán, se eliminó el etanol restante y dejó secar por 5 minutos más. Después se quitó la placa del imán y se agregaron 22.5 μ L de RSB, se selló la placa y agitó a 1800 rpm durante 2 minutos. Se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos, se selló y centrifugó a 280 g por 2 minutos. Se quitó el sello de la placa y se colocó sobre el imán hasta que el líquido estuviese claro (2 minutos). Finalmente se transfirieron 20 μ L del sobrenadante de las columnas NTC a la placa NPP1 y se procedió con el PCR siguiente. De manera opcional, se puede sellar y almacenar la placa a una temperatura en el rango de -25°C a -15°C por un día.

PCR de los índices

Se preparó un termociclador con las condiciones de programa que se aprecian en la tabla 6.

Se trabajaron con 2 sets de índices a la vez, marcados con 4 caracteres (una letra y 3 dígitos) y fácilmente distinguibles por el color de la tapa del tubo. El set de tubos con tapa blanca (i5) se coloca en las filas en la placa (5 μ L/pozo) y el set de tubos con tapa anaranjada (i7) se coloca en las columnas, como lo muestra en la figura 7. Después de la apertura de cada tubo, su tapa se reemplazó con otra tapa nueva del mismo color, para evitar posibles contaminaciones entre índices. Se añadieron 20 μ L de NLM (*Nextera Library Amplification Mix*) a cada pozo, se mezcló por pipeteo, selló la placa y centrifugó a 280 g durante 1 minuto a 20°C. Se colocó la placa en el termociclador y corrió el programa correspondiente. Posterior a esto, se puede proceder a sellar y almacenar las placas a temperatura de 2 a 8°C hasta por dos días, o se puede dejar en el termociclador toda la noche y continuar al día siguiente.

Tabla 6: Programa para la amplificación de los índices. Se describen las condiciones para amplificar los genes con estas secuencias incorporadas.

Tiempo	Temperatura	Ciclos
3 min	72 °C	
30 seg	98 °C	
10 seg	98 °C	12
30 seg	60 °C	
5 seg	72 °C	
5 min	72 °C	
Hold	10 °C	

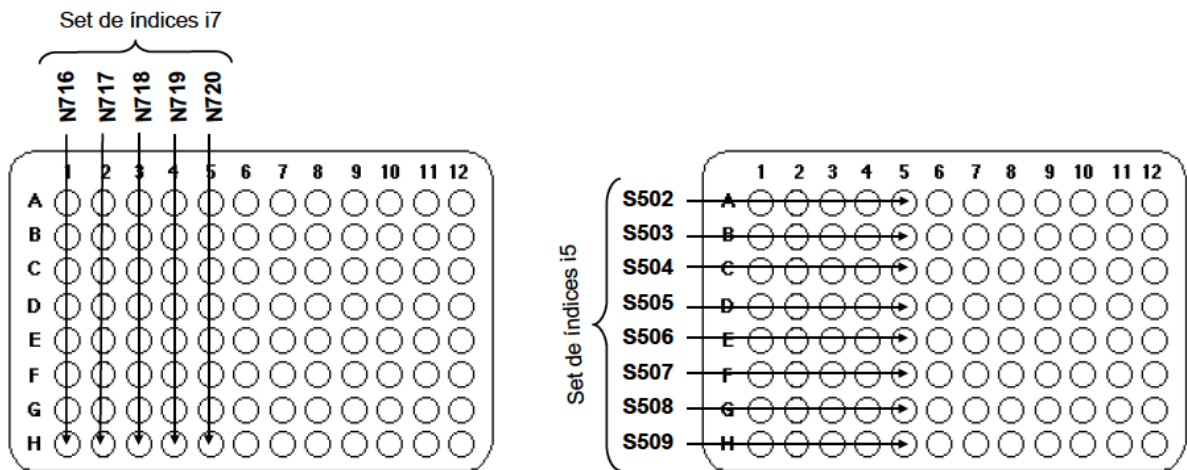


Figura 7. Ejemplo de colocación de los índices. En la imagen se utilizan los sets i7 e i5 para la amplificación de los loci de clase I y II.

Limpieza de los PCR

Terminada la corrida de PCR, los productos se centrifugaron 2 minutos a 280 g. Mientras tanto, se rotuló una placa de PCR como HLP (*HLA Library Plate*) y una placa MIDI como NPC (*Nextera PCR Clean Up*). Se transfirieron las reacciones de la placa NPP1 a las columnas de la placa NPC (que son aproximadamente 50 μ L). Se añadieron 25 μ L de SPB a cada pozo, se selló, agitó a 1800 rpm durante 2 minutos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se quitó el sello de la placa y se colocó sobre el imán. Se esperó a que el líquido estuviese claro (2 minutos) y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 μ L de etanol al 80%, incubó 30 segundos, descartó el sobrenadante, se repitió este lavado con etanol y se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se quitó la placa del imán, se añadieron 32.5 μ L de RSB a cada pozo, se selló la placa y agitó a 1800 rpm durante 2 minutos. Se incubó a temperatura ambiente por dos minutos, quitó el sello de la placa y colocó sobre el imán. Se esperó hasta que el líquido

estuviese claro (2 minutos) y se transfirieron 30 μL del sobrenadante de las columnas NPC a la placa HLP. Si no se procediera inmediatamente después al siguiente paso, se puede almacenar la placa hasta 7 días a una temperatura de 2-8°C.

Preparación del pool de bibliotecas

Se marcó un tubo eppendorf de 1.5 mL como PHL (*Pool HLA Libraries*) y se transfirieron 5 μL de cada uno de los pozos de la placa HLP al tubo PHL. Después se cuantificó el pool de bibliotecas con Qubit BR y determinó el volumen que es necesario desnaturalizar empleando la siguiente fórmula:

$$-0.67(X \text{ ng}/\mu\text{L}) + 11.9 = V$$

dónde: "X" es la concentración del pool en ng/L

"V" es el volumen (μL) del pool para diluir y desnaturalizar

Posteriormente se marcó un tubo eppendorf de 1.5 mL como DHL (*Diluted HLA Libraries*) y se transfirió el volumen calculado previamente, al tubo DHL. Posteriormente se diluyó el pool con agua destilada a un volumen final de 10 μL . Después se añadieron 10 μL de NaOH 0.1 N (preparado fresco a partir de un stock fresco de NaOH 0.2 N en agua grado biología molecular), se dio vórtex y centrifugó brevemente. Se incubó a temperatura ambiente 5 minutos, se añadieron 980 μL de HT1 (*Hybridization Buffer*) previamente a temperatura ambiente, para detener un volumen final de 1000 μL y mezcló finalmente por inversión.

Preparación del control PhiX

Como control para las corridas de secuenciación y alineación de las mismas, se emplea una biblioteca de PhiX, preparada por Illumina. Esta se

mezcla en un porcentaje conocido, con el pool de bibliotecas de las muestras. En un tubo eppendorf de 1.5 mL etiquetado como PhiX_Dil, se combinan 2 μ L de PhiX 10 nM y 3 μ L de Tris HCL 10 mM-0.1%, pH 8.5 Tween 20, lo que permite diluir el PhiX a 4 nM. Después se añaden 5 μ L de NaOH fresco (de máximo 12 horas) al 0.2 N al tubo de PhiX_Dil, se agita brevemente con vórtex y centrifuga a 280 g por 1 minuto. Posteriormente se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se añaden 990 μ L de HT1 frío, al tubo PhiX_Dil. El PhiX 20 pM desnaturalizado puede ser utilizado hasta 3 semanas después de su preparación si se almacena de -15°C a -25°C. Para utilizar el PhiX con reactivos que habrán de introducirse al instrumento MiSeq v2 de Illumina, se tiene que diluir a 12.5 pM. Para ello se etiquetó un tubo *eppendorf* de 1.5 mL como PhiX_12.5, se añadieron 375 μ L de PhiX 20 pM desnaturalizado, se añadieron después 225 μ L de HT1 frío y finalmente se mezcló por inversión. La última preparación antes de correr la secuenciación consiste en mezclar el pool de bibliotecas con 1% del control de PhiX. Se tomaron 594 μ L del tubo DHL (pool de bibliotecas desnaturalizadas), se añadieron 6 μ L del PhiX 12.5 pM (que corresponde a una proporción del 1%), se tapó, mezcló por inversión y se colocó en el pozo marcado como "sample" los 600 μ L de la mezcla de pool de muestras+PhiX. Adicionalmente, antes de comenzar el proceso, debe estar listo y programado el aparato como se describe a continuación.

Preparación del instrumento

Encendido el aparato, cuando se abre la pantalla de bienvenida; en la pantalla de bienvenida, se selecciona también la opción para preparar las condiciones para la corrida en sí. Primeramente se desarrolla un lavado "stand by" para preparar las mangueras de flujo (consiste en dos lavados consecutivos), posteriormente se hace la corrida y finalmente un lavado "post

run", que consiste en un solo ciclo de lavado. Para la corrida, se prepara un cartucho con reactivos, se carga la mezcla de bibliotecas al contenedor correspondiente y se selecciona la opción de "sequence" de la pantalla de bienvenida. Esto despliega varias pantallas de manera ordenada para: abrir *Base Space*, para habilitar el acceso al almacén en la nube y análisis de las secuencias; cargar la celda de flujo. Previamente lavada y secada; cargar los reactivos, para cargar el PR2 (botella de buffer de lavado), vaciar la botella de residuos, cargar el cartucho de reactivos y cambiar la hoja de muestras; hacer una resumen, para confirmar que el software ha localizado la hoja de muestras para la corrida y enlista el nombre de la hoja de muestras y los parámetros proporcionados en la misma; y una revisión previa a la corrida, de los componentes y condiciones antes de permitir que la corrida comience. Posteriormente se selecciona "star run" y en el transcurso de la corrida se puede ir monitoreándola desde la interfase MCS o de otra computadora utilizando el *Sequence Analysis Viewer (SAV)*. La hoja de muestras es un archivo que almacena la información requerida para desarrollar y analizar la corrida de secuenciación. La distribución de los datos que se colocan se puede visualizar en la figura 8. Inicialmente se hace en el programa excel (o en su defecto, una aplicación llamada *Illumina Experiment Manager*) y posteriormente se carga a la computadora del aparato. Cuando la corrida comienza, el software copia la hoja de muestras del folder correspondiente hacia la raíz del folder de datos de salida, y después lo copia hacia la raíz del folder de análisis.

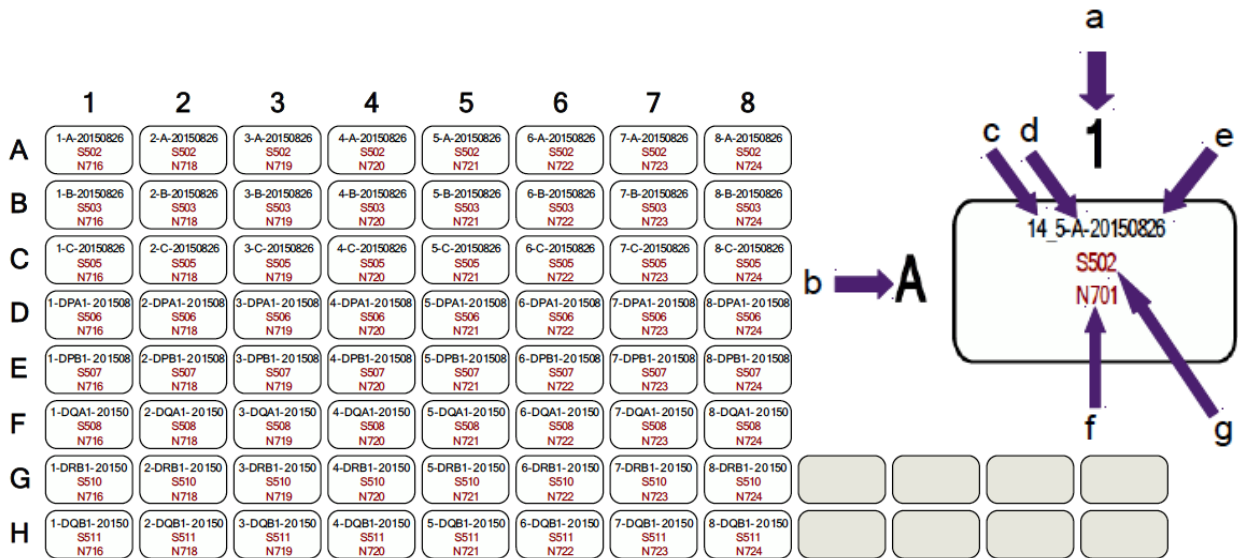


Figura 8. Ejemplo de distribución general de índices para el ensayo de un lote de muestras. En la parte superior derecha se visualiza la forma en que se registran en el *sample sheet*, acorde al pozo en el que se trabaja (por ejemplo pozo 1A como indican las letras a,b), los datos de la muestra (c), el locus a ensayar (d), la fecha en que se realiza el ensayo (e), así como el par de índices utilizados (f,g).

Como se muestra en la figura 9, la hoja de muestras comprende una sección de encabezado que incluye el nombre del investigador, nombre del proyecto, nombre del experimento, fecha, nombre del flujo de trabajo, ensayo y química, así como una sección de lecturas (con el número de ciclos por lectura) y una sección de datos que incluye por ejemplo, el código de identificación de la muestra, nombre de la muestra, el folder de genoma (especifica la ruta hacia los archivos FASTA utilizados para el alineamiento) y los índices utilizados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	[Header]								
2	IEMFileVersion		1						
3	Investigator Name	DrYourName							
4	Project Name	YourProject							
5	Experiment Name	YourExperiment							
6	Date		2/9/2013						
7	Workflow	TruSeq Amplicon							
8	Assay	Amplicon							
9	Description	Sequencing							
10	Chemistry	Default							
11	[Manifests]								
12	A	TruSeq_Control_Manifest_ACPI_PN15025138							
13	B	TruSeq_CAT_Manifest_TC0H1MAF3-CAT							
14	[Reads]								
15		151							
16		151							
17	[Settings]								
18	Adapter	CTGTCTCTTATACACATCT							
19									
20	[Data]								
21	Sample_ID	Sample_Name	Sample_P	Sample_V	Index	Index2	Descriptio	GenomeF	Manifest
22	10002-R1	TSControl	hfghfgh	A001	ATCACGA	TGAACCTI	descriptio	\\sd-isil	or A
23	10003-R1	NA19145	hfghfgh	A002	ACAGTGG	TGAACCTI	descriptio	\\sd-isil	or B
24	10004-R1	NA18505	hfghfgh	A010	CAGATCC	TGAACCTI	descriptio	\\sd-isil	or B
25	10005-R1	NA18856	hfghfgh	A11	ACAAACG	TGAACCTI	descriptio	\\sd-isil	or B
26	10006-R1	NA19152	hfghfgh	B03	ACCCAGC	TGAACCTI	descriptio	\\sd-isil	or B
27	10007-R1	NA19139	hfghfgh	B04	AACCCCT	TGAACCTI	descriptio	\\sd-isil	or B

Figura 13. Hoja de muestras.

3.8 Análisis de los datos

3.8.1 Asignación de genotipos por locus

Se utilizó *Conexio Assign* para analizar las secuencias de las bibliotecas procesadas en el MiSeq. Este programa permite importar los archivos FASTQ de múltiples muestras y múltiples genes por muestra simultáneamente (24 muestras por proyecto), posibilita realizar el llamado de las bases, editar las secuencias de ser necesario, realizar el control de calidad de cada muestra y de diferentes corridas, comparar la secuencia consenso de la muestra con la biblioteca de secuencias de alelos HLA descritos hasta el momento, tipifica los alelos HLA y genera reportes que incluyen alelos CWD, alelos del grupo P y alelos del grupo G. Primeramente se importaron los datos (Figura 10) lo cual tarda horas o minutos, dependiendo del número de archivos y de la computadora, posteriormente se esperó a que el análisis automático se haya

desarrollado, de manera que en el transcurso se generaron los alineamientos, llamado de bases y asignaciones de genotipos correspondientes.

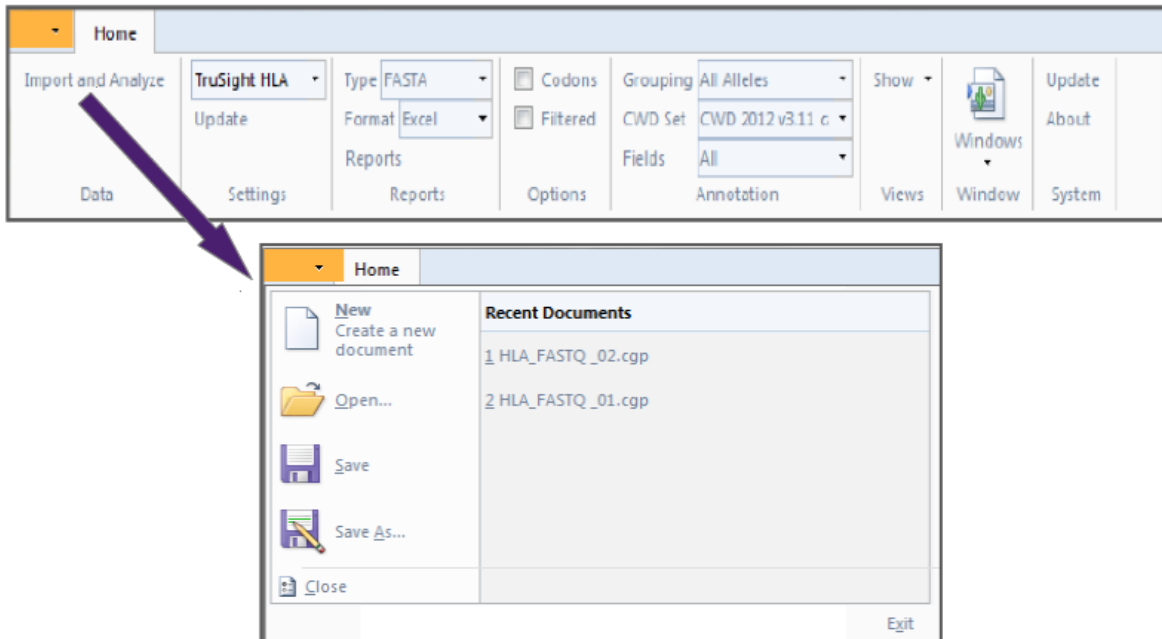


Figura 10. Ruta de importación de datos. Los archivos son seleccionados de la pestaña que se encuentra del lado izquierdo a "Home". Con las flechas del teclado se localiza el menú "File", con éste se puede abrir, crear un nuevo proyecto o guardarlo.

La pestaña "Home" se divide en los siguientes grupos: "Data", "Settings", "Reports", "Options", "Annotation", "Views", "Window" y "System". El grupo de "Data", permite importar y analizar datos de secuencias. Para ello, se debe navegar al folder que contiene los archivos FASTQ y seleccionar el archivo individual o el conjunto de archivos correspondientes. Después se da "click" en "Open" y el análisis comienza de manera automática posterior a la importación de los archivos. Cada locus genera un archivo FASTQ para la lectura 1 y otro para la lectura 2; los dos archivos son importados y analizados simultáneamente para un análisis óptimo. El grupo de "Views", permite navegar

entre varios p neles para ver los datos de las secuencias de distintas maneras. Al seleccionar "Summary" por ejemplo, se pueden trabajar con 3 p neles, uno con el que se puede visualizar la genotipificación, uno que muestra el porcentaje de lecturas con un Q30 mayor o igual a 30 (Q30), o bien, el resumen del panel de cobertura que permite ver la profundidad de la cobertura de secuenciación. El grupo "Annotation" es útil para consolidar anotaciones en los grupos G, grupos P o bien, muestra todos los alelos que pudiesen corresponder en el panel de resultados; el set CWD muestra una lista de alelos comunes y bien documentados, los cuales se indican en negritas en el panel de resultados (Figura 11).

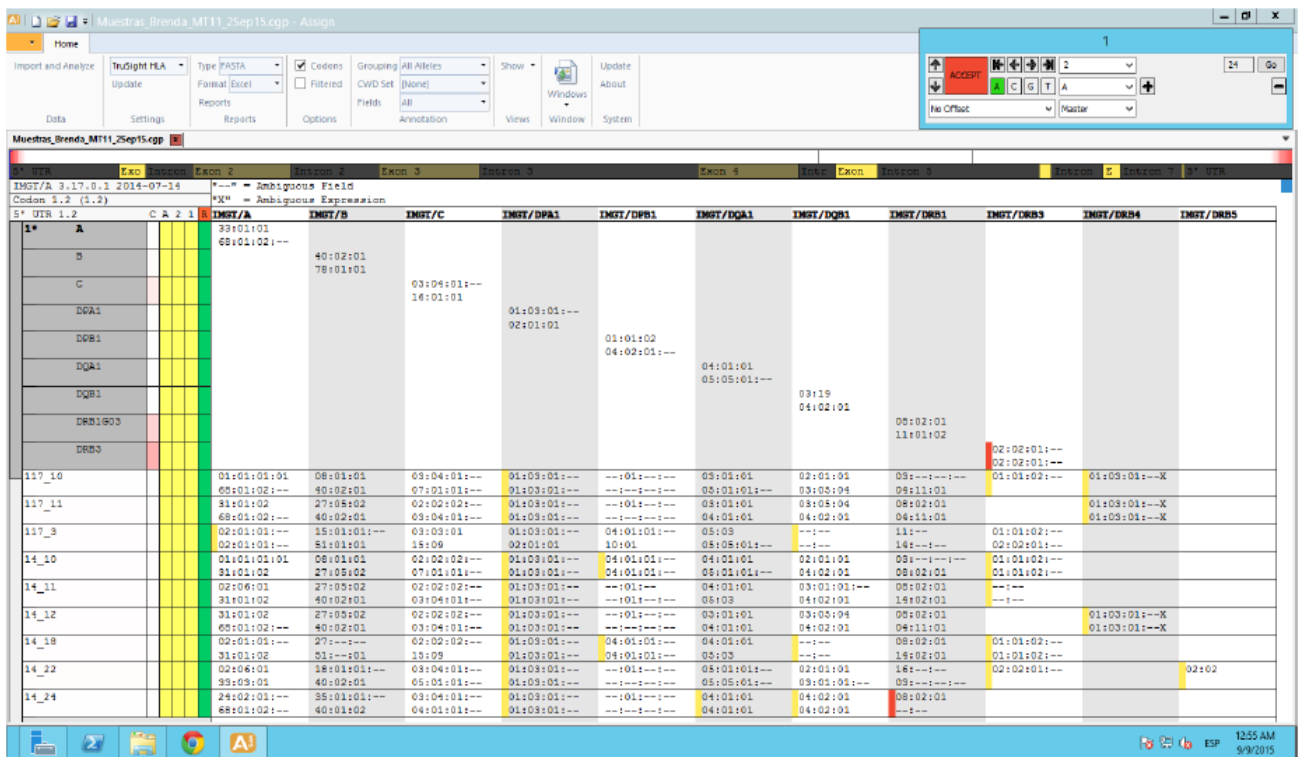


Figura 11. Panel de resultados visualizado a través del programa Conexio Assign. Del lado izquierdo sombreado en gris, se pueden apreciar los distintos loci ensayados para las muestras. Del lado derecho, se identifican las tipificaciones correspondientes, obtenidas mayormente a alta resolución.

3.8.2 Análisis estadísticos adicionales

Adicionalmente se determinaron las frecuencias fenotípicas y genotípicas, heterocigotos y homocigotos, para cada alelo en las familias analizadas. Se obtuvo el porcentaje correspondiente a los alelos correlacionados con distintos grupos étnicos. También se determinó la frecuencia de expresión de antígenos del sistema ABO por conteo directo de los datos. Se estimó manualmente utilizando hojas de cálculo de Microsoft Excel®, la frecuencia haplotípica de combinaciones de 3 (para genes de clase I y clase II de manera independiente) y 8 loci, valorando el patrón de segregación entre generaciones y se compararon también estos hallazgos conforme a lo reportado en la literatura para identificar los haplotipos de distintos grupos étnicos. Se obtuvo finalmente el perfil epidemiológico de la comunidad, con base en el análisis de parámetros sociodemográficos tales como edad, sexo, escolaridad, nivel de dominio de idioma kumiai, estado civil, hábitos de consumo del alcohol, tabaquismo y drogas, así como en el de sus parámetros clínicos fisiopatológicos (antecedentes personales y familiares, nivel de glicemia, parámetros hematológicos) y no fisiopatológicos (grupo sanguíneo).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Se pudieron identificar un total de 60 antígenos distintos. De éstos, 29 (48.33%) son codificados por genes de clase I y 31 (51.66%) son codificados por genes de clase II. Aquellos cuya mayor diversidad fue evidente, correspondieron a los HLA-A, HLA-B, HLA-C y los HLA-DRB1, aportando un 13.33%, 21.66%, 13.33%, y 13.33% respectivamente a esta variabilidad. Por el contrario, los antígenos HLA-DRB3, -DRB4, -DRB5 y -DPA1 aportaron de manera minoritaria a esta variación con 2 (3.33%), 1 (1.66%), 2 (3.33%) y 2 (3.33%) antígenos diferentes respectivamente. Adicionalmente, la tabla 7 muestra las frecuencias (f) de los distintos alelos de clase I encontrados en los individuos estudiados. Tanto para HLA-A y HLA-B se identificaron 14 alelos, sin embargo fueron sólo 11 los encontrados para HLA-C. El coeficiente de consanguinidad arrojado fue de 1.56×10^{-9} , 8.3×10^{-10} y 4.73×10^{-9} para los genes HLA-A, -B y -C respectivamente.

Tabla 7: Frecuencias genotípicas calculadas para los alelos de clase I. Se realizó para dicho fin, un conteo manual, confirmado por una aplicación disponible en <http://hla-net.eu/tools/frequency-estimation/>

HLA-A	F	HLA-B	F	HLA-C	F
A*02:06	0.1714	B*40:02	0.3428	C*03:04	0.3857
A*68:01	0.1714	B*27:05	0.1428	C*02:02	0.1428
A*31:01	0.1428	B*35:01	0.1285	C*04:01	0.1285
A*02:01	0.1285	B*08:01	0.0714	C*07:01	0.0857
A*24:02	0.1142	B*44:02	0.0571	C*07:04	0.0571
A*01:01	0.1142	B*18:01	0.0571	C*05:01	0.0571
A*33:03	0.0428	B*51:01	0.0571	C*15:09	0.0571
A*24:22	0.0285	B*40:01	0.0285	C*07:02	0.0285
A*02:05	0.1428	B*39:02	0.0285	C*06:02	0.0285
A*11:01	0.1428	B*45:01	0.0285	C*03:01	0.1428
A*68:03	0.1428	B*57:03	0.1428	C*16:01	0.1428
A*34:02	0.1428	B*15:01	0.1428		
A*33:01	0.1428	B*53:01	0.1428		
A*68:93	0.1428	B*78:01	0.1428		

La tabla 8 muestra las frecuencias de los 8, 9, 2 y 9 distintos alelos identificados para HLA-DQA1, -DQB1, -DPA1 y -DPB1 de clase II, respectivamente. El coeficiente de consanguinidad arrojado fue de 4.8×10^{-8} , 0.0108, 0.3922 y 3.44×10^{-8} para el orden mencionado de los genes.

Tabla 8: Frecuencias genotípicas calculadas para los alelos DQA1, DQB1, DPA1 y DPB1 de clase II.

HLA-DQA1	F	HLA-DQB1	f	HLA-DPA1	F	HLA-DPB1	F
05:03	0.2285	03:01	0.3850	01:03	0.9289	04:01	0.3714
04:01	0.2142	03:01	0.2147	02:01	0.0710	04:02	0.3286
05:05	0.1857	03:01	0.1436			03:01	0.1571
05:01	0.1714	03:01	0.0718			02:01	0.0429
03:01	0.1142	03:01	0.0698			104:01	0.0285
02:01	0.0428	03:01	0.0430			01:01	0.0285
03:03	0.0285	03:01	0.0430			05:01	0.0143
01:02	0.0143	03:01	0.0143			10:01	0.0143
		03:01	0.0143			02:01	0.0143

En el caso de la tabla 9, se aprecian las frecuencias de los genes restantes de clase II. De HLA-DRB1 se identificaron 13 alelos distintos, de -DRB3 y 5 se encontraron 2 y de -DRB4 solamente 1. El coeficiente de consanguinidad, al igual que para el resto de los alelos analizados se calculó a través de HLA.net, arrojándose un valor de 8.4×10^{-9} .

Tabla 9: Frecuencias genotípicas calculadas para los alelos DRB1/3/4/5 de clase II.

HLA-DRB1	F	HLA-DRB1	f	HLA-DRB3	F	HLA-DRB5	F
14:02	0.2285	04:07	0.0285	01:01	0.3142	01:01	0.1428
08:02	0.2142	11:01	0.0285	02:02	0.1285	02:02	0.0143
03:01	0.1428	04:01	0.0285				
16:02	0.1428	11:03	0.0143				
04:11	0.0714	15:03	0.0143	HLA-DRB4	F		
07:01	0.0428	04:03	0.0143	01:03	0.1857		
12:01	0.0285						

Las gráficas mostradas en las figuras 12 a 17 permiten visualizar más adecuadamente la frecuencia alélica que oscila entre 0.0142 y 0.9289, donde 0.0142 corresponde a la frecuencia de los alelos encontrados en una sola ocasión de las posibles 70 (considerando $2n$, donde n son los 35 individuos analizados) y 0.9289 es la frecuencia del alelo más representado.

En el caso de HLA-A los más predominantes fueron A*68:01, A*02:06 y A*31:01 encontrados en 12 (17.14%), 12 (17.14%) y 10 (14.29%) ocasiones respectivamente. De HLA-B, los alelos más frecuentes fueron 40:02, 27:05 y 35:01, repitiéndose en 34.28%, 14.28% y 12.85% de las veces. El alelo 03:04 del gen HLA-C fue el más representativo en un 38.57%, seguido del 02:02 y 04:01 en porcentajes de 14.28 y 12.85 respectivamente.

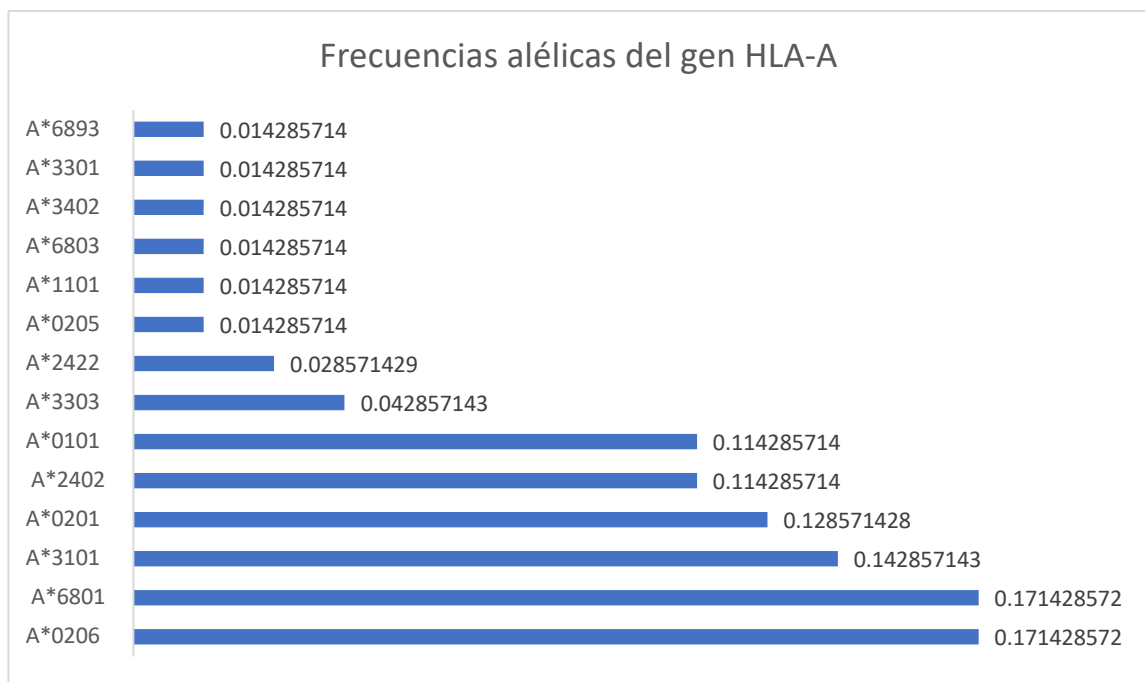


Figura 12. Frecuencias alélicas del gen HLA-A.

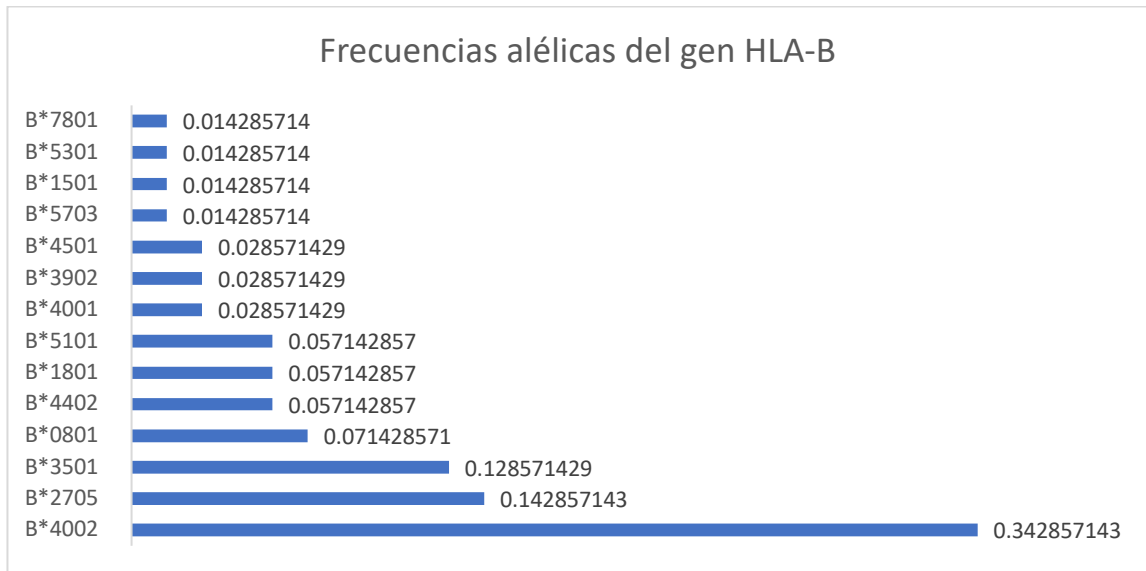


Figura 13: Frecuencias de los alelos del gen HLA-B.

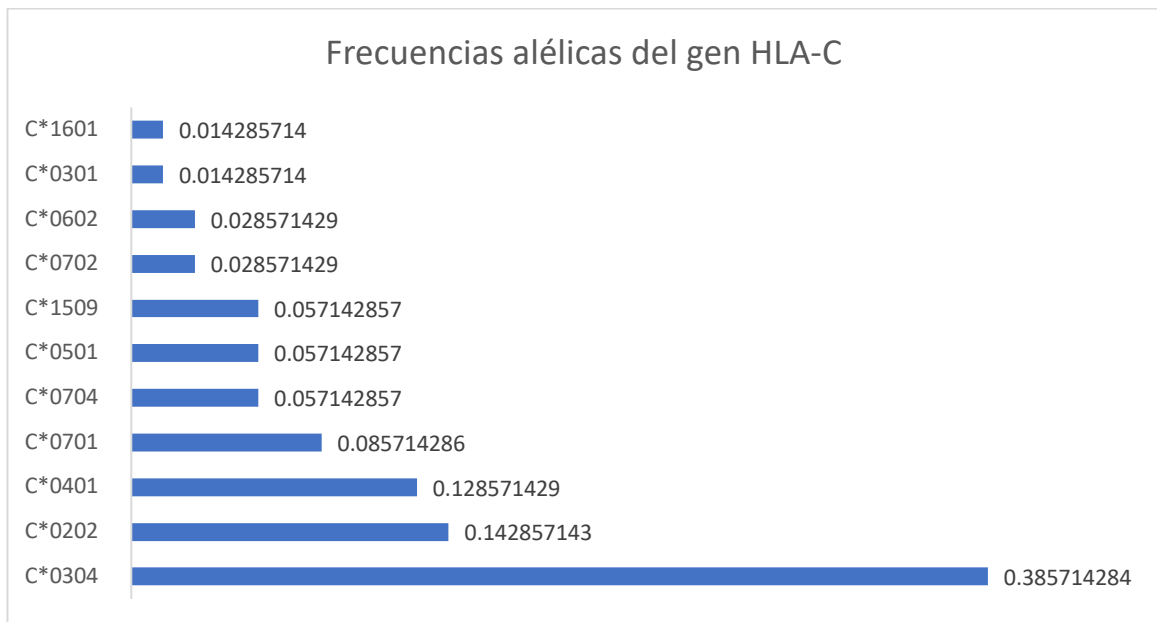


Figura 14: Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-C.

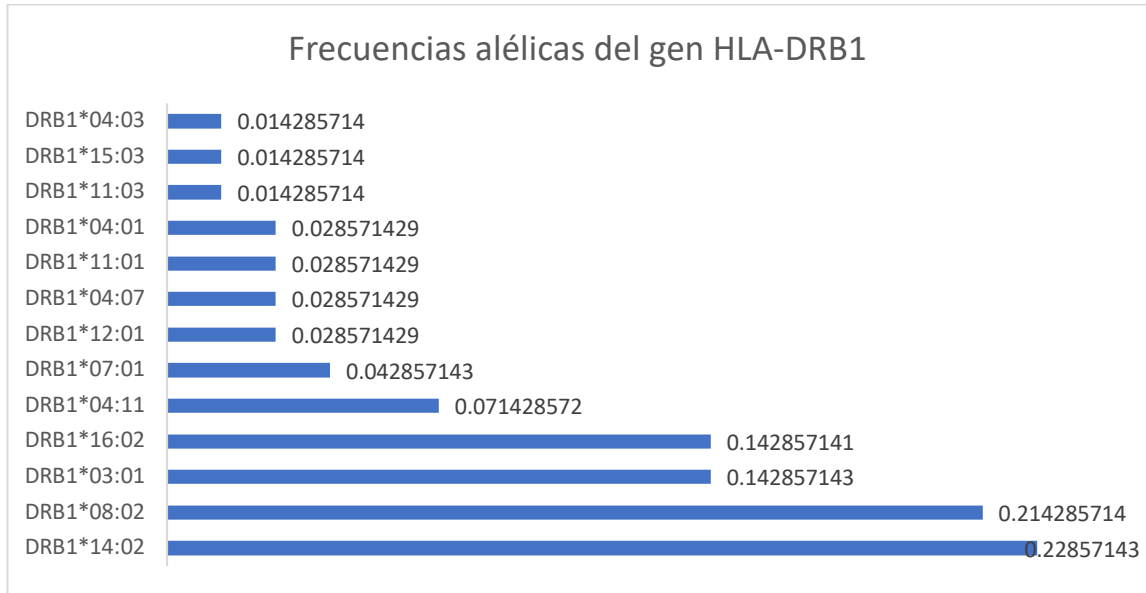


Figura 15: Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DRB1.

Del gen HLA-DRB1 se identificó al alelo 14:02 como el más representado en un 22.85%, seguido de 08:02 que fue encontrado en 15 ocasiones. La diversidad de genes DRB3/4/5 no se representó gráficamente, su variabilidad fue muy limitada y sólo en uno de los 35 individuos no se concretó su tipificación. De HLA-DQA1, se identificaron a 05:03 y 04:01 como los alelos mayoritarios en porcentajes de 22.85 y 21.42 respectivamente. HLA-DQB1 se representó por los alelos 03:01 y 04:02 en un 38.5% y 21.47% acorde a ese orden. Por otro lado, el alelo de HLA-DPA1 que estaba presente en casi todos los individuos analizados fue 01:03 (92.89%) y para HLA-DPB1, los alelos 04:01 y 04:02 se hicieron presentes en un 37.14% y 32.85% de las ocasiones.

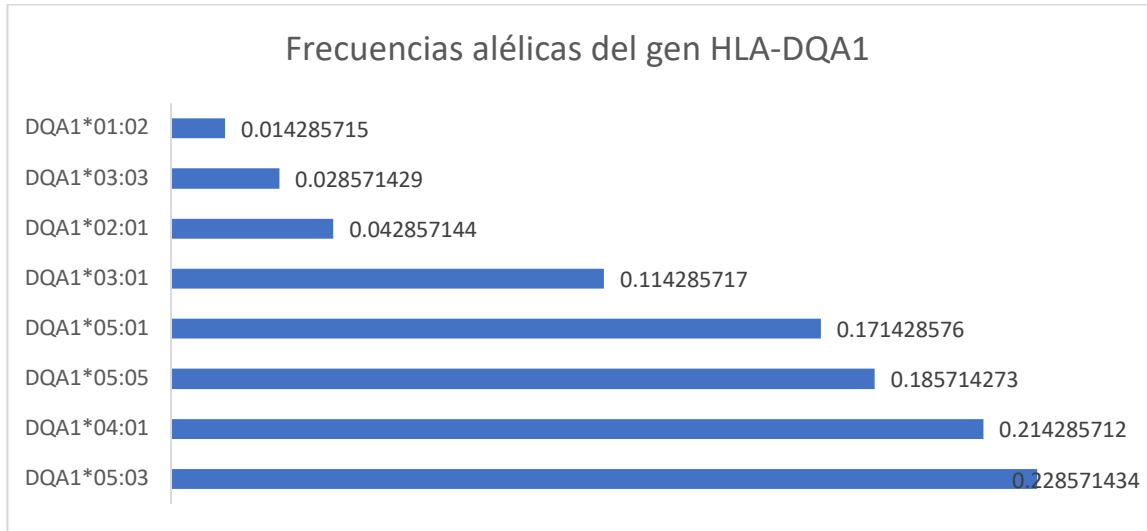


Figura 16: Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DQA1

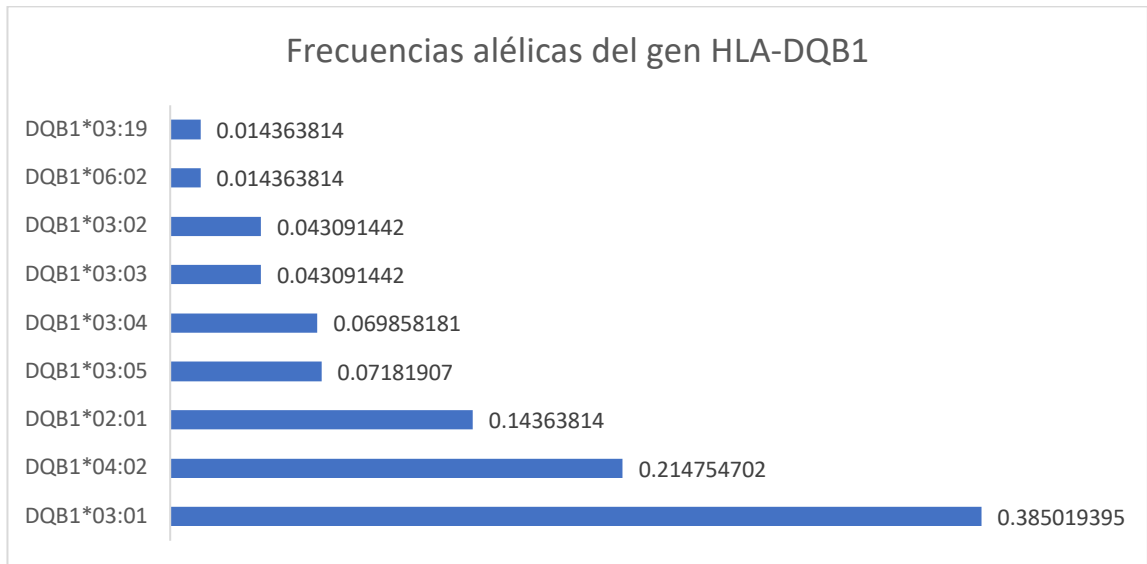


Figura 17: Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DQB1

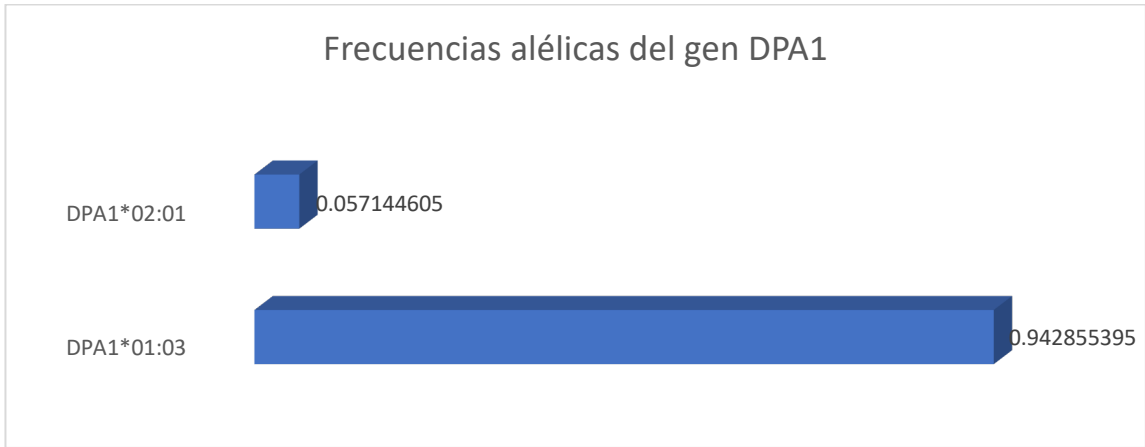


Figura 18: Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DPA1.

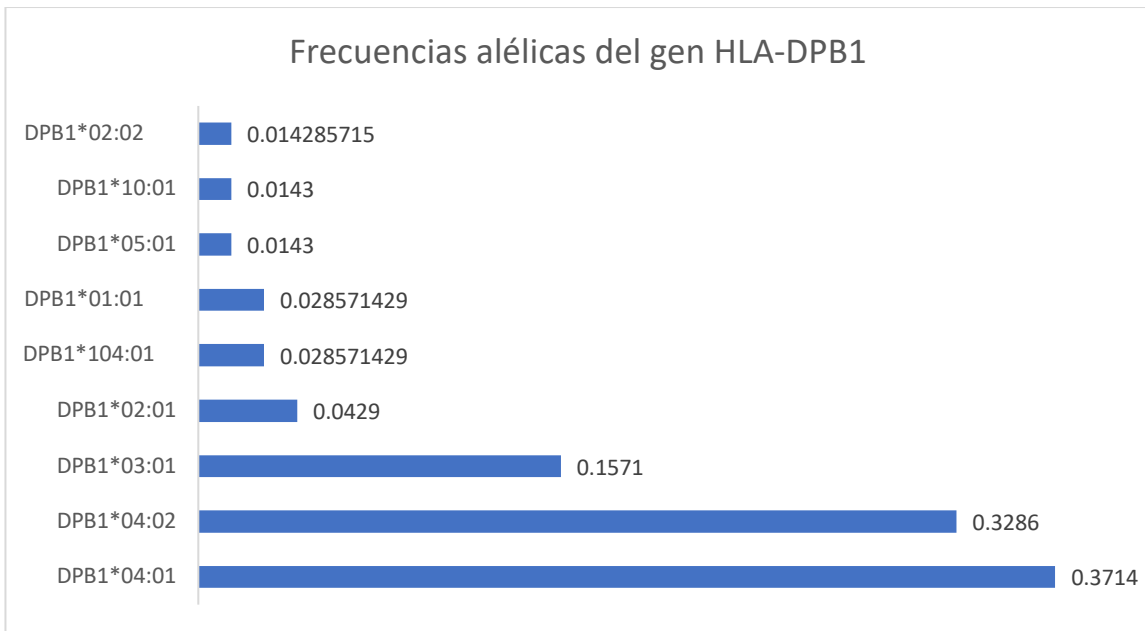


Figura 19: Frecuencias correspondientes a los alelos del gen HLA-DPB1

De los 85 distintos alelos encontrados en total, 28 fueron identificados a través de resolución media (2 pares de dígitos) y 57 a través de alta resolución (3 pares de dígitos o más). Adicionalmente al hallazgo de las distintas variantes, se procedió a compararlas con la base de datos en *allele frequencies.net* para catalogarlos acorde a lo que se ha reportado previamente para diferentes grupos étnicos. Se encontró que de los 85 alelos, 44.7% tenían origen amerindio, 12.94% eran de origen caucásico, 8.23% de origen africano, 8.23% asiático y 20% de ellos no se pudo determinar por su ausencia en la base de datos utilizada o bien, se encontraba frecuentemente en diversos tipos de poblaciones, lo que dificultó catalogarlo con un origen específico. La figura 20, permite visualizar dicha distribución.

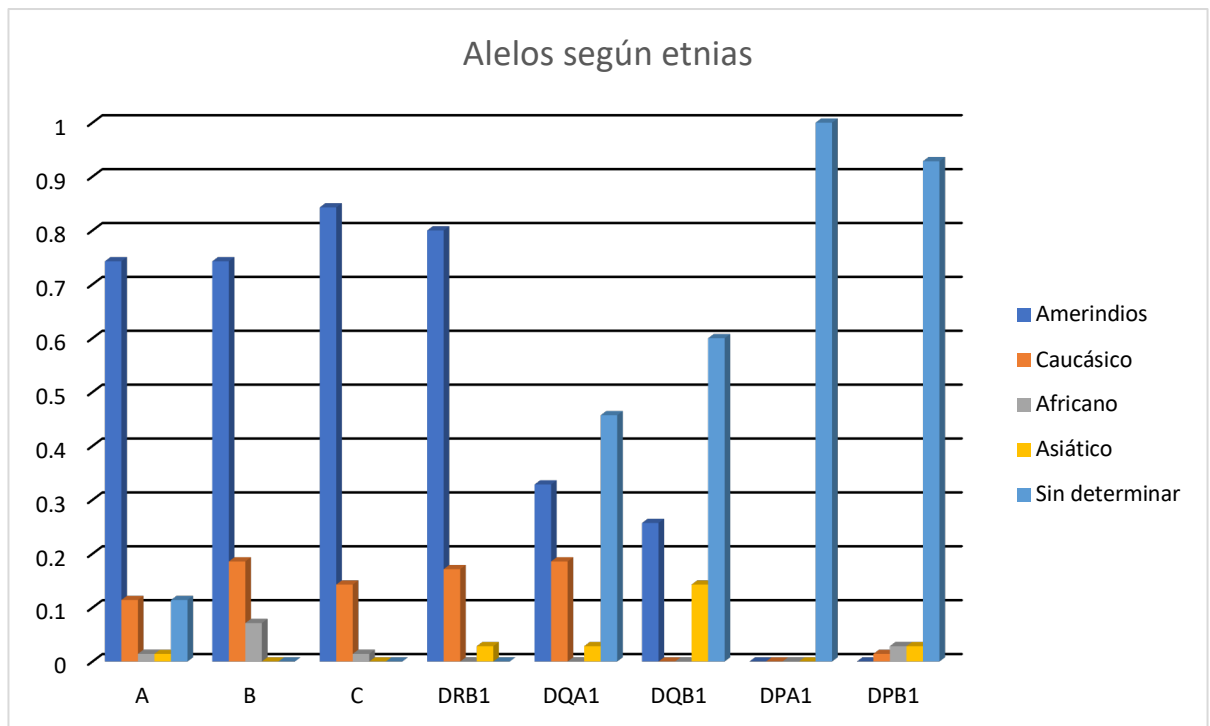


Figura 20: Distribución de alelos acorde a frecuencias encontradas y grupo étnico asociado. El mayor porcentaje de alelos son de tipo amerindio.

En la tabla 10 se enlistan las cantidades de genotipos distintos encontrados y su frecuencia dentro del mismo locus. Fueron un total de 125, y como es de apreciarse, la mayor parte de ellos son heterocigotos (87.2%), encontrándose la mayor diversidad en el locus A, seguido del B, DRB1 y finalmente el C. El locus con menos variabilidad genotípica es el DPA1. Adicionalmente, considerando que DRB3, 4 y 5 no se expresan en todos los individuos, o bien pudiera existir sólo uno de estos tipos en una persona, se optó por conjuntarlos dentro de una misma categoría.

Tabla 10: Distribución de genotipos homocigotos y heterocigotos en los individuos analizados.

Locus	Homocigotos		Heterocigotos	
	Cantidad de genotipos distintos	f	Cantidad de genotipos distintos	F
HLA-A	1	0.0285	22	0.9714
HLA-B	1	0.0571	19	0.9428
HLA-C	1	0.0571	16	0.9428
HLA-DRB1	2	0.0571	17	0.9428
HLA-DRB3/4/5	3	0.1428	2	0.8571
DQA1	2	0.0857	12	0.9142
DQB1	3	0.2571	13	0.7428
DPA1	1	0.8857	1	0.1142
DPB1	2	0.1428	8	0.8571

En la tabla 11 adicionalmente se enlistan los 23 haplotipos encontrados, al analizar los bloques de genes de clase I. Los más representados fueron A*02:06/B*40:02/C*03:04 y A*68:01/B*40:02/C*03:04 en un 17.14% y 14.28% respectivamente. En términos generales, 44.28% de los haplotipos son catalogados como de origen amerindio, 2.85% de origen africano, 20% caucásico, 15.71% de origen asiático, 5.71% mestizo mexicano y a 11.42 % no se le pudo encontrar correlación acorde a la base de datos utilizada (Figura 21). En la tabla 11 también se encuentran los 22 haplotipos distintos con algunos genes de clase II, los más representativos son DRB1*16:02/DQB1*03:01/DPB1*04:02, DRB1*14:02/DQB1*03:01/DPB1*03:01 y DRB1*08:02/DQB1*04:02/DPB1*04:01 en un 14.28%, 14.28% y 12.85% respectivamente; 40% de todos estos son de origen amerindio, 18.57% de origen caucásico, 2.85% africano, 2.85% asiático y a 35.71% no fue posible determinarlo acorde a la información disponible en la base de datos.

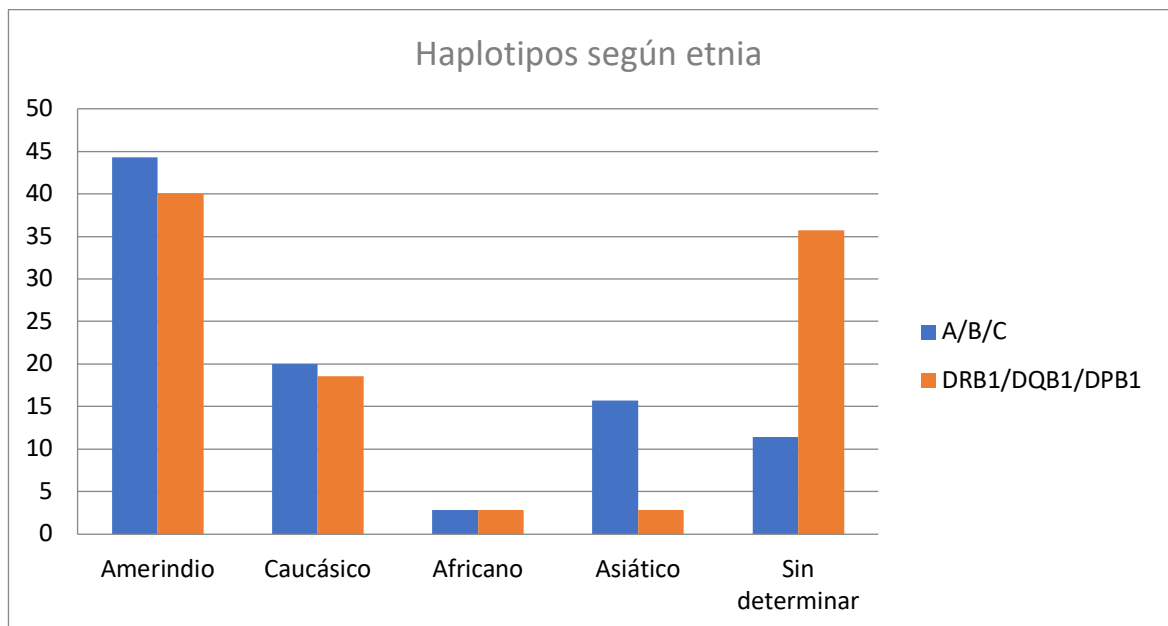


Figura 21: Distribución de haplotipos acorde al grupo étnico de origen. Los resultados son expresados términos de porcentaje.

En las figuras 22 y 23 se muestran los *pedigrees* de las familias estudiadas. De todos los individuos, sólo 29 se pudieron integrar a los núcleos familiares y 6 quedaron fuera de éstas asociaciones. Las claves de identificación de las personas que fueron parte de la investigación se encuentran debajo del símbolo respectivo para cada individuo.

Tabla 11: Distribución de haplotipos con genes de clase I (izquierda) y clase II (derecha). Se expresa en términos de % del total.

Haplotipo	%	Haplotipo	%
A*02:06/B*40:02/C*03:04	17.14	DRB1*16:02/DQB1*03:01/DPB1*04:02	14.28
A*68:01/B*40:02/C*03:04	14.28	DRB1*14:02/DQB1*03:01/DPB1*03:01	14.28
A*31:01/B*27:05/C*02:02	12.85	DRB1*08:02/DQB1*04:02/DPB1*04:01	12.85
A*24:02/B*35:01/C*04:01	10	DRB1*03:01/DQB1*02:01/DPB1*04:01	11.42
A*01:01/B*08:01/C*07:01	7.14	DRB1*04:11/DQB1*03:05/DPB1*04:02	7.14
A*02:01/B*51:01/C*15:09	5.71	DRB1*14:02/DQB1*03:04/DPB1*04:01	5.71
A*01:01/B*44:02/C*07:04	4.28	DRB1*08:02/DQB1*04:02/DPB1*04:02	5.71
A*33:03/B*18:01/C*15:01	4.28	DRB1*07:01/DQB1*03:03/DPB1*04:01	4.28
A*68:01/B*40:01/C*03:04	2.85	DRB1*12:01/DQB1*03:01/DPB1*02:01	2.85
A*24:22/B*45:01/C*06:02	2.85	DRB1*04:07/DQB1*03:02/DPB1*04:02	2.85
A*24:02/B*57:03/C*07:01	1.42	DRB1*04:01/DQB1*03:01/DPB1*104:01	2.85
A*02:05/B*40:02/C*03:04	1.42	DRB1*03:01/DQB1*02:01/DPB1*02:01	1.42
A*02:01/B*39:02/C*07:02	1.42	DRB1*14:02/DQB1*03:01/DPB1*04:02	1.42
A*11:01/B*44:02/C*07:04	1.42	DRB1*11:01/DQB1*03:01/DPB1*04:01	1.42
A*68:03/B*39:02/C*07:02	1.42	DRB1*14:02/DQB1*03:01/DPB1*05:01	1.42
A*02:01/B*35:01/C*04:01	1.42	DRB1*08:02/DQB1*04:02/DPB1*03:01	1.42
A*31:01/B*35:01/C*04:01	1.42	DRB1*11:03/DQB1*03:04/DPB1*10:01	1.42
A*33:01/B*78:01/C*16:01	1.42	DRB1*15:03/DQB1*06:02/DPB1*01:01	1.42
A*68:93/B*40:02/C*03:04	1.42	DRB1*11:01/DQB1*03:19/DPB1*01:01	1.42
A*02:01/B*18:01/C*05:01	1.42	DRB1*04:03/DQB1*03:02/DPB1*04:02	1.42
A*34:02/B*53:01/?	1.42	DRB1*03:01/DQB1*02:01/DPB1*02:02	1.42
A*02:01/B*15:01/C*03:01	1.42	DRB1*14:02/DQB1*03:01/DPB1*04:01	1.42
A*02:01/B*27:05/C*02:02	1.42		

Finalmente, se dan a conocer los hallazgos epidemiológicos acorde a la información proporcionada únicamente por los individuos a los que se hizo el estudio genético. Otros miembros de la comunidad accedieron a ofrecer dicha

información, lo que será de utilidad para darle continuidad a la investigación en un futuro, pero por el momento se describen las características sociodemográficas de 35 participantes. En la figura 24 se puede apreciar cómo el grupo mayoritario con el que se trabajó, era el femenino. Las mujeres por lo general fueron más accesibles para formar parte del estudio, propensas a conocer su estado de salud y proporcionar las muestras solicitadas. En cuanto a edad, acorde a los rangos en los que se dividieron, es notable que la mayor parte de ellos tiene una edad que oscila entre los 18 y 47 años (Figura 25).

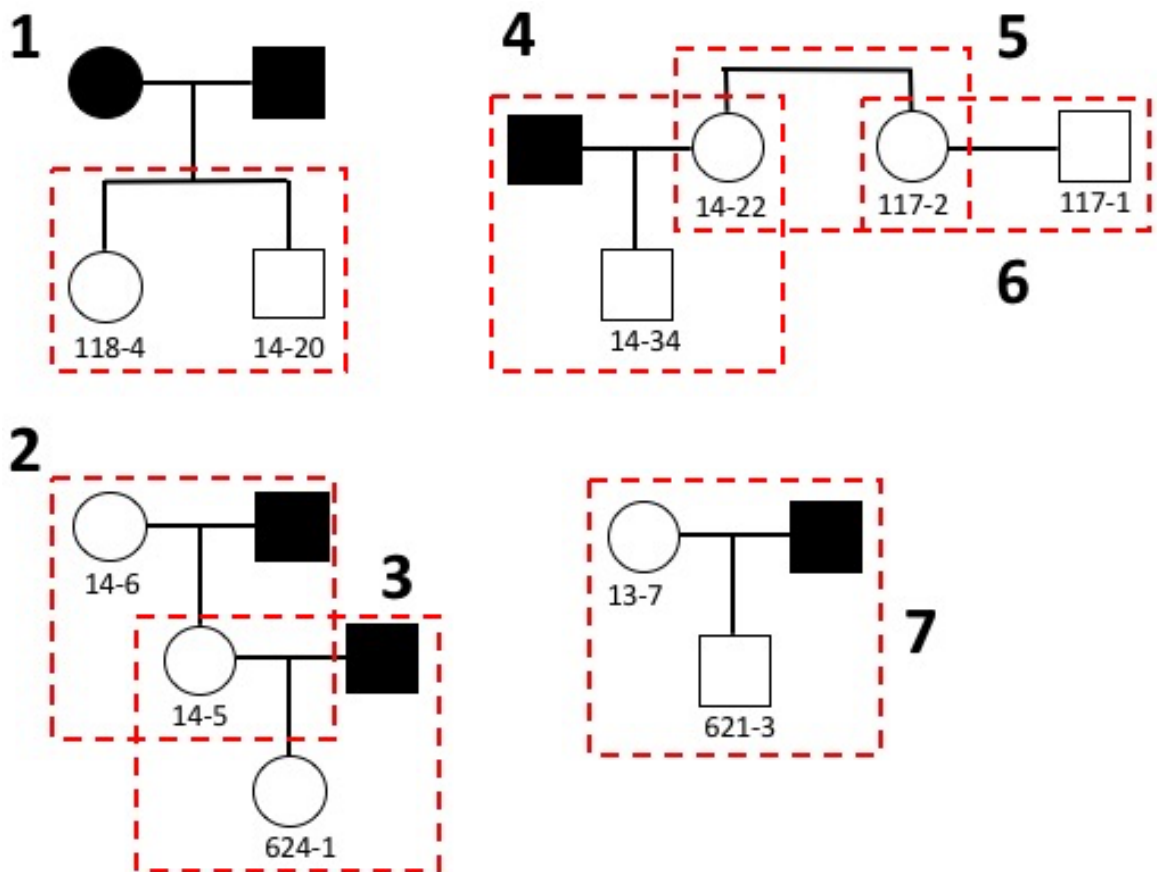


Figura 22: Pedigrees de 7 familias nucleares. Los individuos cuyo símbolo se encuentra sombreado son aquellos que no fueron partícipes del estudio. Los hombres se encuentran representados a través de cuadrados y las mujeres por círculos. Se encierran con líneas punteadas rojas, los miembros de cada familia nuclear, y el número de familia se identifica en negrita por fuera del área señalada.

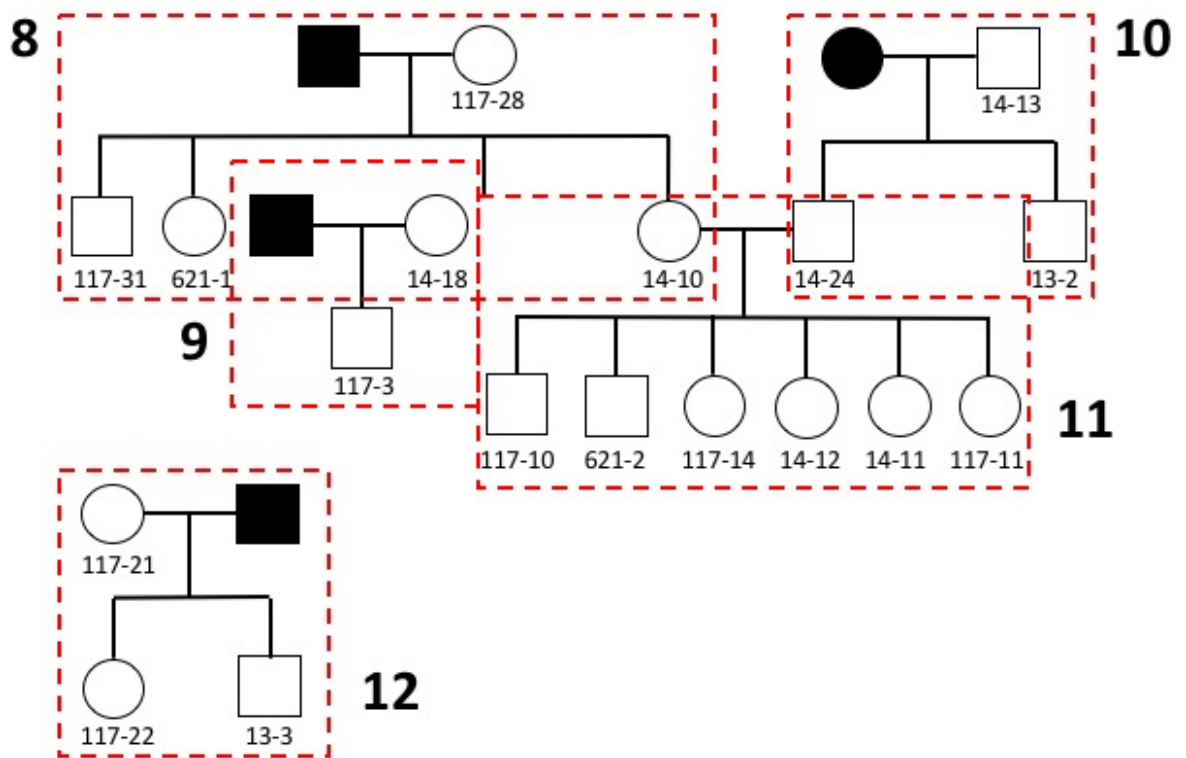


Figura 23: Pedigrees de las 5 familias nucleares restantes. El significado de la simbología es como se describe en la figura previa.

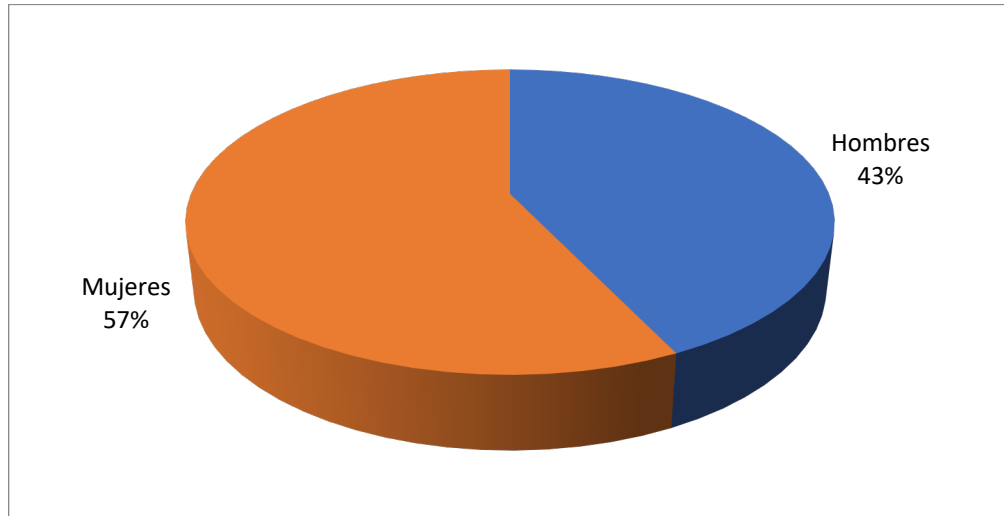


Figura 24: Distribución por sexo. El grupo de mujeres se encuentra representado mayoritariamente.

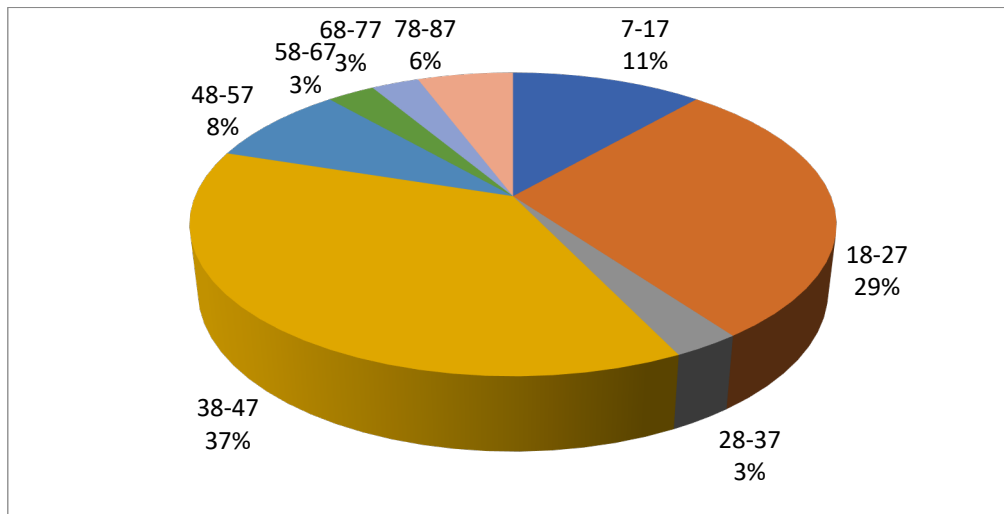


Figura 25: Distribución por rangos de edad. Se generaron 8 grupos con base en esta característica, los individuos en etapa de adultez representan el grupo mayoritario de participantes.

La figura 26 revela el estado civil predominante. Incluso en el caso de aquellos individuos que no formaron parte del estudio, predomina este estado o el de unión libre, categoría ausente dentro de los participantes analizados.

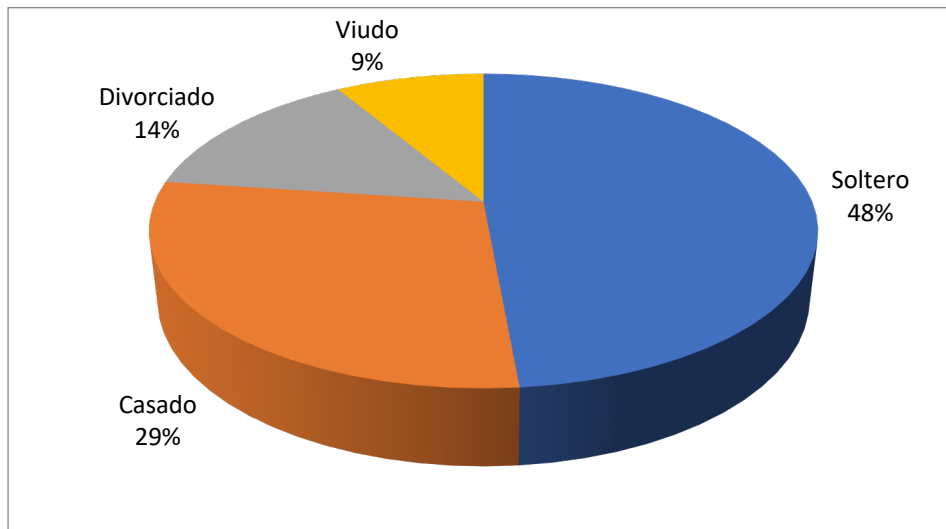


Figura 26: Distribución por estado civil. Se generaron 4 grupos acorde a dicha característica, identificándose al 50% de los individuos como solteros.

En la actualidad, la comunidad hace esfuerzos importantes por preservar su cultura nativa, y una de las estrategias es la enseñanza del idioma a nivel básico en las instituciones edificadas dentro de la comunidad. La gran mayoría de la población por lo menos comprende el idioma, pero una buena proporción tiene conocimiento extenso de ella, sobre todo los adultos y ancianos (Figura 27). La figura 28 da a conocer las condiciones de educación, la falta de educación básica (sin considerar a los niños y jóvenes que se encuentran estudiando o no están en edad aún de estudiar), influye evidentemente en su cultura y los oficios en los que se pueden desempeñar, que son limitados.

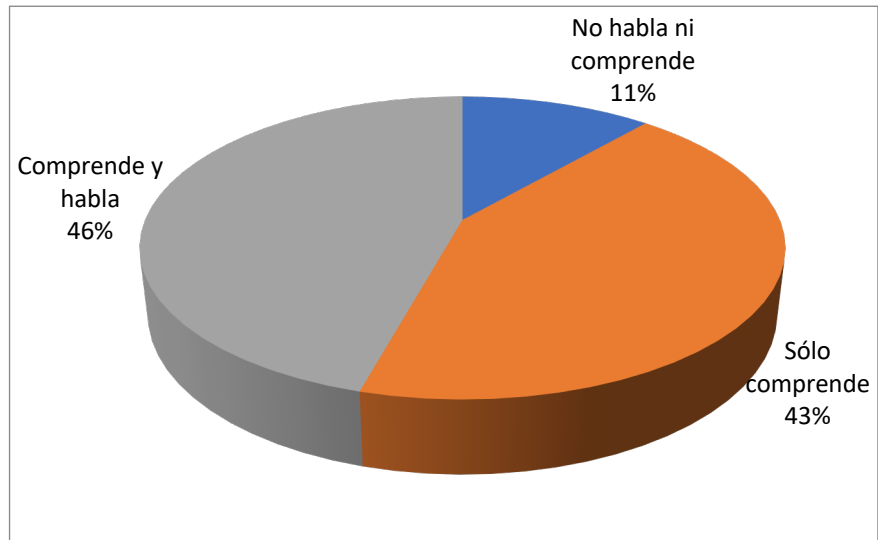


Figura 27: Distribución acorde a nivel de dominio de idioma kumiai. Se puede apreciar como prácticamente el 50% de los participantes del estudio tienen dominio del idioma a nivel de comprensión y comunicación verbal.

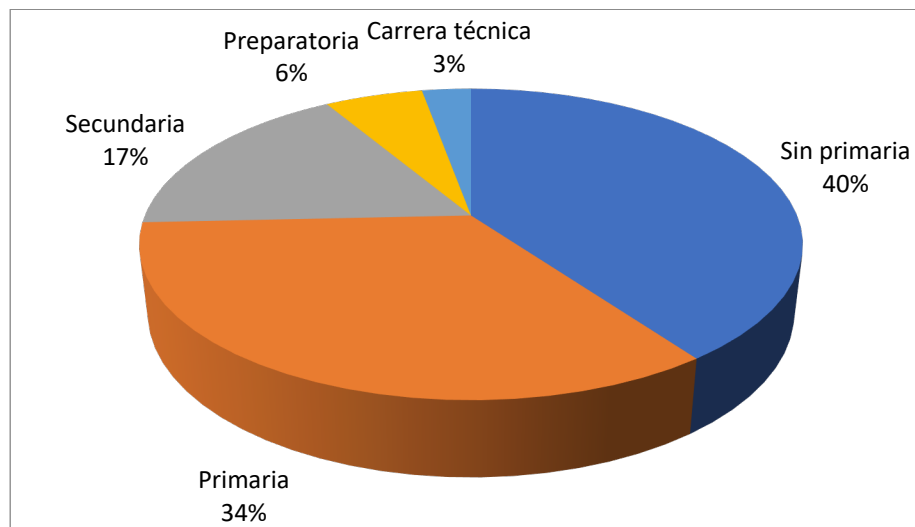


Figura 28: Distribución por escolaridad. La mayor parte de los individuos no tienen estudios de nivel básico.

Los ancianos refieren no haber tenido la posibilidad de estudiar por falta de instituciones educativas en su momento, incluso aquellas personas con posibilidad (en términos de edad) de seguir estudiando, optan por desarrollar algún oficio remunerado para aportar a la manutención familiar. La figura 29 muestra los oficios más comunes entre hombres y mujeres en edad productiva. La mayor parte de los participantes se queda trabajando en las labores propias del hogar, mientras hace labores artesanales, y el grupo representado posteriormente es el de los estudiantes.

En términos de conductas, se preguntaron aspectos relacionados con hábitos de consumo de alcohol, tabaco y drogas. A excepción no un individuo que no formó parte del estudio, no existían indicios de que alguno de ellos consumiera estupefacientes. Adicionalmente, como se muestra en la figura 30, si bien, la mayoría de los participantes no realizaban las prácticas mencionadas, quienes lo hacían, era en una frecuencia baja.

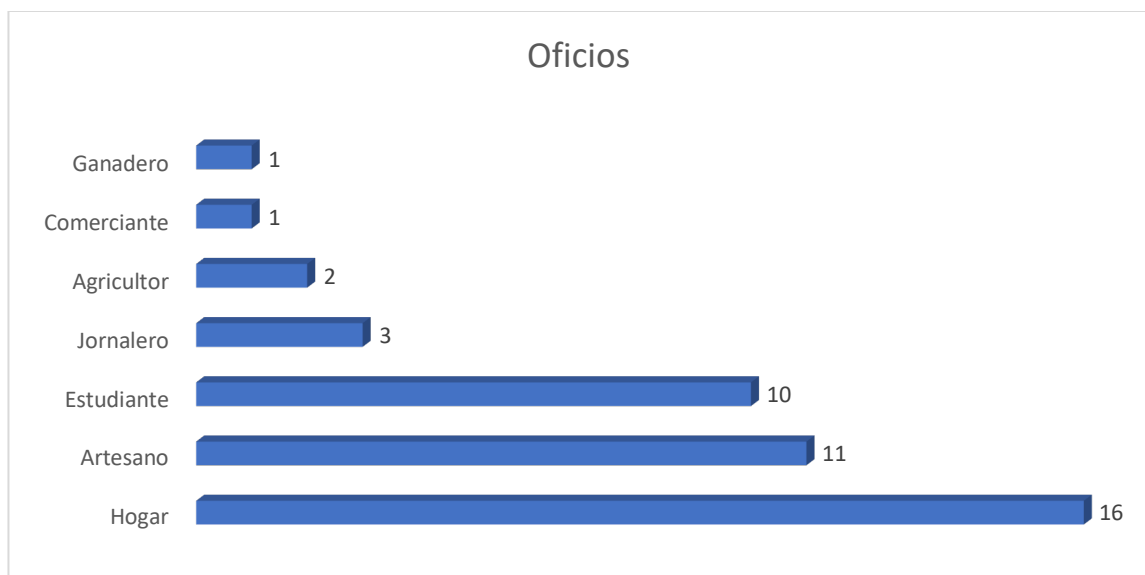


Figura 29: Distribución por tipo de ocupación. Se representan los valores numéricos totales acorde a la información referida por los participantes, puesto que varios de ellos desarrollaban más de un oficio simultáneamente.

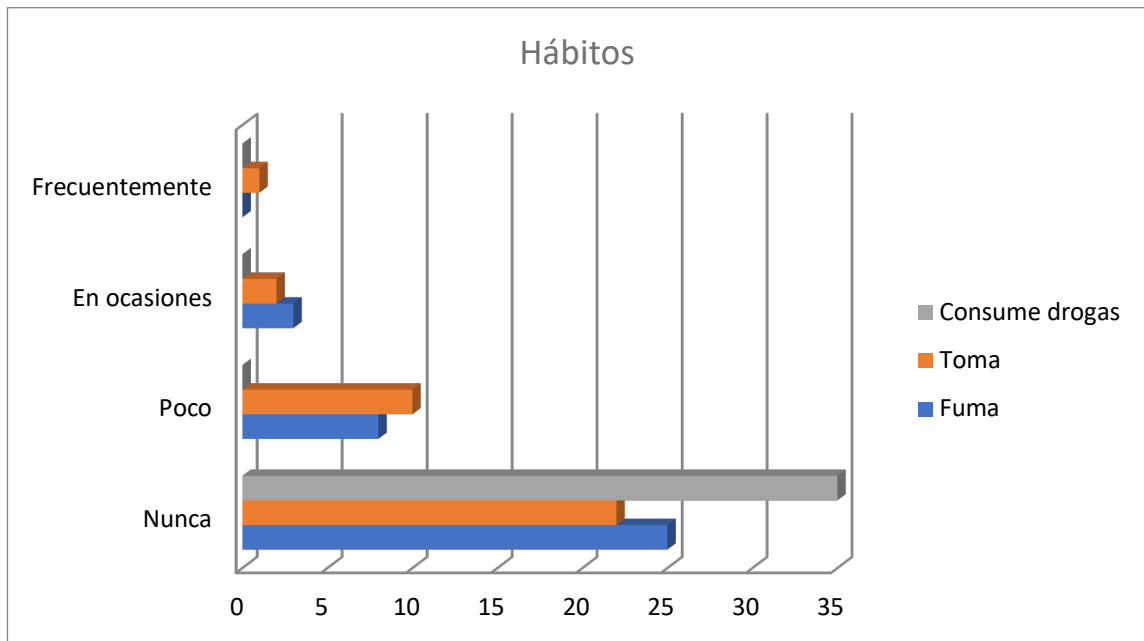


Figura 30: Distribución acorde a tipos de hábitos. En términos globales los participantes no practicaban los hábitos cuestionados. Los resultados son expresados en números totales de individuos.

En relación al área clínica, la figura 31 da a conocer que el 86% de los participantes posee como marcador sanguíneo de grupo "0" Rh positivo. Tomando en cuenta las frecuencias fenotípicas, acorde a la ecuación mencionada previamente para la determinación de frecuencias genotípicas ($p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$) para alelos múltiples, se procedió a calcular p, q y r, obteniéndose un valor de p de 0.0598, 0.0145 para q y 0.9257 para r. Considerando que los genotipos $I^A I^A$, $I^A I^O$, $I^B I^B$, $I^B I^O$, $I^A I^B$ y $I^O I^O$ tienen las frecuencias genotípicas p^2 , $2pr$, q^2 , $2qr$, $2pq$ y r^2 respectivamente, la relación de las frecuencias se determinaron como se menciona en la tabla 12. La suma de las frecuencias genotípicas de p^2 y $2pr$ equivale a la frecuencia fenotípica del grupo A, la suma de q^2 y $2qr$ equivale a la frecuencia fenotípica del grupo B,

$2pq$ equivale a la frecuencia fenotípica del grupo AB y r^2 es equivalente a la frecuencia fenotípica del grupo "O".

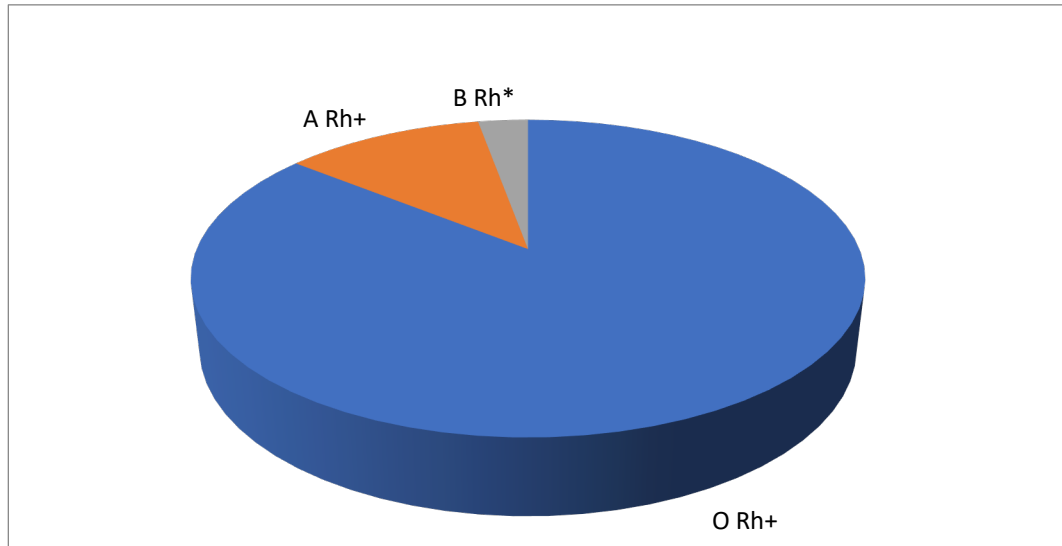


Figura 31: Distribución por tipo de grupo sanguíneo.

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y fenotípicas de los marcadores de grupos sanguíneos.

Genotipo	Frecuencia genotípica	Fenotipo	Frecuencia fenotípica
$I^A I^A$	0.0035	A	0.1142
$I^A I^O$	0.1107		
$I^B I^B$	0.0002	B	0.0285
$I^B I^O$	0.0268		
$I^A I^B$	0.0017	AB	0
$I^O I^O$	0.8569	O	0.8571

También se hicieron valoraciones en relación al nivel sérico de glucosa y biometrías hemáticas, éstas últimas para reconocer posibles estados de anemia entre los participantes, por lo que se puso especial énfasis al nivel de hemoglobina o glóbulos rojos. La figura 32 permite visualizar que la gran mayoría de los participantes tenían sus valores dentro de rangos normales

para ambos parámetros del análisis hemático. A excepción de uno de los participantes, a todos se les desarrolló este examen. En el caso del nivel de glicemia, no todos cumplieron con las condiciones apropiadas para desarrollar dicha valoración, por lo que en la mayoría de los participantes no se pudo determinar. En el caso de aquellos que sí, la mayoría obtuvo resultados dentro del límite normal, pero hubo varios casos de hiperglicemia en ayuno. Los resultados de la gráfica son mostrados en términos de valores totales de participantes.

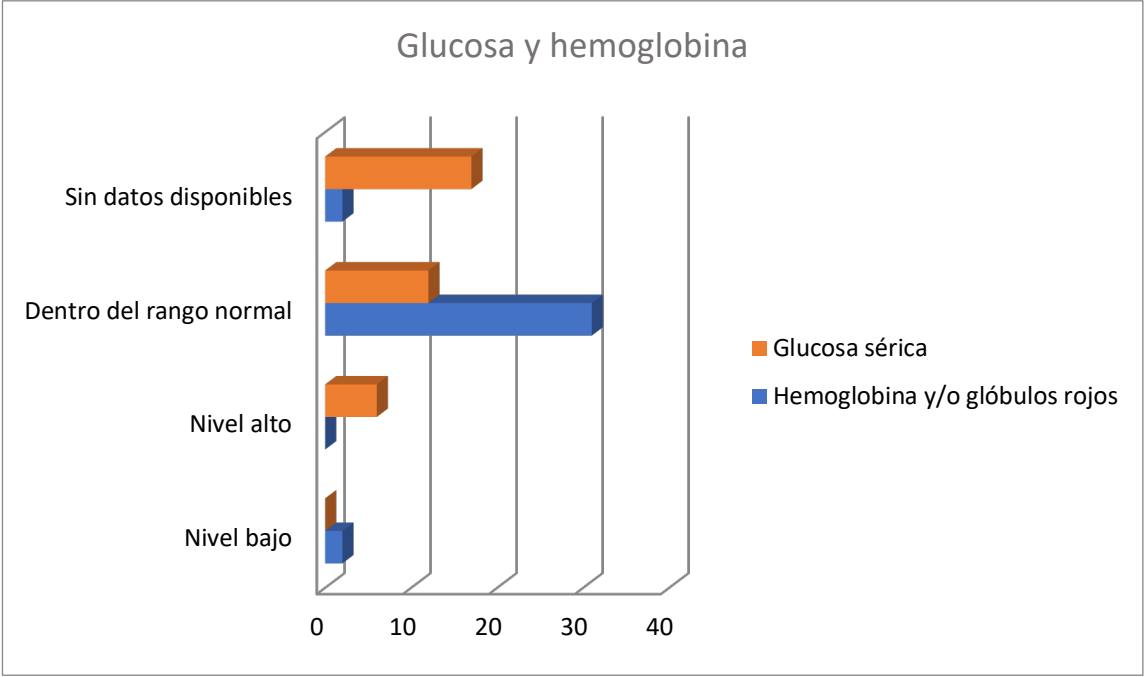


Figura 32: Distribución por nivel de glicemia y hemoglobina/glóbulos rojos. En relación a los participantes que accedieron a realizarse estos estudios, la mayor parte mostró resultados dentro del rango normal.

En la figura 33 se aprecian 9 tipos de enfermedades crónicas referidas por los individuos en estudio. Si bien, como antecedentes personales no

presentaron en alta frecuencia, no fue así al solicitar identificarlas en sus familiares inmediatos o de segundo orden. Las enfermedades identificadas en los familiares de la mayor parte de los participantes fue diabetes mellitus en primera instancia, seguido de hipertensión arterial. Se representan los valores numéricos totales, considerando que algunas personas refirieron más de un tipo de antecedente.

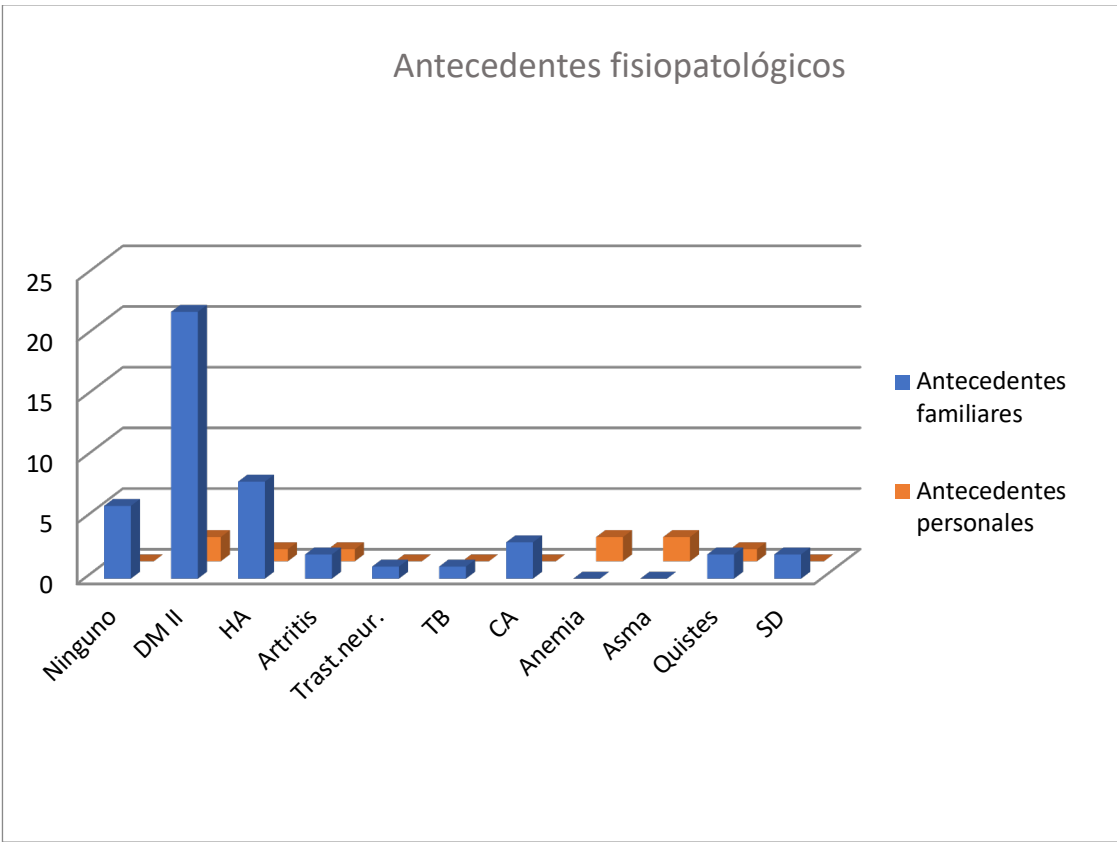


Figura 33: Distribución acorde a antecedentes fisiopatológicos. Las abreviaciones tienen los siguientes significados: DM II es diabetes mellitus tipo II, HA es hipertensión arterial, Trast.neur. Es trastornos neurológicos (no identificado de manera específica por parte del familiar), TB es tuberculosis pulmonar, CA es cáncer (de ubicación variable), y SD significa sin datos disponibles (participantes no recuerdan o tienen conocimiento de dichos antecedentes familiares).

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Acorde a los hallazgos derivados del trabajo, se pueden encontrar varios aspectos en común respecto a estudios realizados en otras poblaciones. Haciendo un enfoque en los alelos étnico-específicos que comúnmente se encuentran en los *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-DRB1, en términos generales, antígenos como HLA-A*02, A*24, A*31, A*68, HLA-B*35, HLA-C*03, C*04, C*07, HLA-DRB1*08, DRB1*14, DQB1*03 son marcadores que se han identificado desde hace más de 20 años de origen amerindio, inclusive por lo menos un alelo de cada uno de ellos se encontró presente en los individuos de estudio. Las frecuencias en las que se hallaron varían, pero indudablemente auxilia en la identificación de aquellos que pudiesen jugar un rol epidemiológico relevante entre estos tipos de poblaciones. Estudios en la población de los mayos al norte de México, coinciden al encontrar algunos marcadores con frecuencias importantes, como por ejemplo A*02, A*24 y B*35, o bien A*02, A*31, A*24 y B*35 en caso de indios havasupai que se ubican al sur de Estados Unidos, miembros del mismo tronco lingüístico que los individuos en estudio^{48,59,64}.

Analizando los genes de clase I y su frecuencia en indios pimanos de Arizona –que pudiesen guardar una relación estrecha con los ancestros de los actuales kumiai, debido a su ubicación geográfica- se ha manifestado frecuentemente el alelo HLA-A*24:02; entre los kumiai fue el cuarto más frecuente, sin embargo al revisar su origen, no se pudo concretar debido a su amplia distribución en poblaciones, sin embargo, HLA-B*35:01, HLA-C*03:04 y 04:01 se ha identificado en otras etnias autóctonas de Asia, Estado Unidos y México.

Respecto a los genes de clase II, locus DRB1, específicamente el alelo DRB1*08:02:01 está descrito como presente en casi todas las poblaciones amerindias. En seris es el segundo más frecuente y no es la excepción en este grupo de estudio, puesto que es el segundo más representado; una investigación realizada en otomíes, lo describe como el alelo más frecuente y se menciona como el más representado al norte del país incluyendo en tarahumaras, donde el 35% de la población lo posee. En ese estudio en otomíes se mencionan 47 alelos DRB1 propios de amerindios; todos los que se encontraron en este trabajo a excepción de DRB1*11:03 y 04:01 coincidieron con esa literatura y búsquedas adicionales llevaron a identificar el origen asiático y caucásico respectivamente de ellos. Adicionalmente, el gen del mismo locus, DRB1*16:02, encontrado en un 14% entre los kumiai (el tercer alelo DRB1 más frecuente), no se representó en el estudio en otomíes, por lo que les llevó a la conclusión de que su origen era mesoamericano considerando su falta de representatividad al norte del país. Esta conclusión pudiese ser refutada considerando que aquellos individuos en los que se encontró, sólo refirieron ancestría española y kumiai, en España no se encuentra frecuente y en grupos del sur de Estados Unidos como pima, zuni y siux sí se encuentra importantemente representado^{50,57}. Siguiendo con el mismo marcador, el alelo 14:02, descrito como sonda para identificar poblaciones pertenecientes al este de Asia, resultó ser el más frecuente en los individuos en estudio, incluso se ha encontrado en indios athabaskan de Canadá, pimas y amerindios del río Gila de Estados Unidos, en indios tarahumaras y seris de México, así como en muchas etnias al sur de América. Esto sugiere que sea un gen seleccionado de manera preferente y que ha subsistido a través de generaciones y migraciones desde Asia hasta el sur de América⁶¹⁻⁶³. Curiosamente el alelo DRB1*03:01, tercero más frecuente dentro de los participantes, y DQB1*03:01, el más frecuente de ese *locus* en kumiais, se han encontrado de manera importante en iraníes; con

la intención de establecer una relación en particular con esa población, si bien DRB1*03:01 se ha identificado en algunas poblaciones amerindias, se encuentra también altamente representado en grupos caucásicos; adicionalmente respecto a DQB1*03:01, se llegó a la conclusión que en lo general, era un alelo común de poblaciones alrededor del mundo por lo que no pudo realizar una asociación específica⁵⁴.

Siguiendo con los genes de clase II, se encontraron similitudes con los genes DQB1. Sus alelos 04:02 y 03:01 (segundo y tercero más frecuente de ese locus) fueron los dos alelos más frecuentes entre los kumiai (segundo y primero respectivamente). Éstos también han sido descritos en seris, mayos, tarahumaras y una gran variedad de grupos sudamericanos, sin embargo el 03:01 se encuentra ampliamente distribuido por el mundo, de modo que no se puede considerar como marcador amerindio *per se*. En relación a DQA1, dentro de los 3 alelos más frecuentes en seris, se encuentran 04:01 y 05:01, que coincide con el segundo y cuarto alelo más frecuente en kumiais. En el caso de 04:01, se puede sugerir un fenómeno similar al alelo amerindio DRB1*14:02, sin embargo el alelo 05:01 es un marcador prácticamente genérico^{55,59,62,63}.

En términos de haplotipos, acorde a la literatura citada previamente, se han encontrado similitudes aunque en frecuencias restringidas con indios havasupai, respecto a A*02/B*51 y A*31/B*35, con mayos con el haplotipo A*02/B*39/DRB1*04:07/DQB1*03:02, así como con pimanos con el haplotipo A*02:01/DRB1*14:02 e indios navajo en relación a A*24/B*35, A*02/B*40 y A*2/B*35. Acorde a bloques conformados por los genes HLA-A, B y C, los haplotipos más frecuentes coincidieron con hallazgos en poblaciones del este de América (A*68:01/B*40:02/C*03:04) o bien amerindias (A*24:02/B*35:01/C*04:01 y A*02:06/B*40:02/C*03:04), aportando entre los 3, un 41.42% de la frecuencia haplotípica; al revisar haplotipos que incorporan exclusivamente genes de clase II, se pueden identificar varios en común

respecto con amerindios colombianos como es el caso de DRB1*16:02/DQB1*03:01/DPB1*04:02, altamente representado entre los yucpa de Venezuela y que está presente en un 14.28% entre kumiais. Otros haplotipos con 2 genes de clase II que se han identificado como nativos americanos frecuentes, se encuentran en conjunto en una frecuencia de 0.5, tal es el caso de DRB1*08:02/DQB1*04:02, DRB1*04:07/DQB1*03:02, DRB1*14:02/DQB1*03:01 y DRB1*16:02/DQB1*03:01 (mayor aportación dada por el primero, en un 21.43%) y en condiciones variables de frecuencia, se identificaron 6 haplotipos en común con indígenas tarahumaras, para el caso de DRB1*04:07/DQB1*03:02/DPB1*04:02, DRB1*14:02/DQB1*03:01/DPB1*04:02, DRB1*08:02/DQB1*04:02/DPB1*04:02, DRB1*04:03/DQB1*03:02/DPB1*04:02, DRB1*14:07/DQB1*03:01/DPB1*04:01 y DRB1*08:02/DQB1*04:02/DPB1*04:01 siendo este último, uno de los más frecuentes dentro de los participantes de la investigación (12.85%). También se pudieron identificar haplotipos caucásicos en bloques de por lo menos 5 genes de ambas clases como son A*02:01/B*18:01/C*05:01/DRB1*03:01/DQB1*02:01, A*33:03/B*18:01/C*05:01/DRB1*03:01/DRB3*02:02/DQA1*05:01/DQB1*02:01/ DPA1*01:03 y A*01:01:01/B*08:01:01/C*07:01:01/DRB1*03:01:01:01/DRB3*01:01:02/DQB1*02:01:01/DQA1*05:01:01. Para el caso de los individuos en estudio, considerando bloques de genes de clase I y II, se pudieron identificar los dos más frecuentes: A*02:06/B*40:02/C*03:04/DRB1*14:02/DRB3*01:01/DQA1*05:03/DQB1*03:01/ DPA1*01:03/DPB1*03:01 y A*31:01/B*27:05/C*02:02/DRB1*08:02/DQA1*04:01/DQB1*04:02/DPA1*01:03/ DPB1*04:01, aportando un 24.28% a la frecuencia de los 29 haplotipos completos identificados.

En cuestión de los hallazgos alélicos o haplotípicos y su relación con la clínica, se puede hacer alusión a la probabilidad de algunos de los miembros a desarrollar artritis reumatoide, acorde al marcador reportado de susceptibilidad para la enfermedad DRB1*14:02. Incluso una de las participantes, la única que refiere dicha enfermedad como antecedente clínico personal, posee ese alelo, pero casi el 23% de los participantes tendría el riesgo de desarrollarlo, puesto que es el alelo DRB1 más frecuente entre ellos.

Adicionalmente, en la literatura se describe HLA-A*02 como un marcador de susceptibilidad de diabetes tipo II; más del 30% de los objetos de estudio tiene un alelo relacionado con éste padecimiento y en términos generales, más del 50% de los individuos refirieron tener antecedentes familiares con diabetes mellitus tipo II. Sin embargo como esto no se encuentra vinculado con la totalidad de los individuos cuyas glucosas séricas se encuentran en niveles altos, debido a que sólo el 50% de éstos tenía algún alelo del marcador HLA-A*02 presente, no se puede establecer una relación definitiva. En relación a otros marcadores también para diabetes tipo II, se han descrito en mexicanos la presencia de varios alelos de susceptibilidad tales como DRB1*03:01, DQA1*05:01, DQB1*03:02 y DQB1*02:01, que fueron identificados en 10, 12, 3 y 10 de nuestros sujetos de estudio en su mayoría de manera heterocigota, sin embargo los alelos DRB1*16:02 y DRB1*08:02, presentes en 8 y 13 de los individuos también fueron identificados y éstos son relacionados más bien con la resistencia a la enfermedad.

Procesos de origen infeccioso, también se ha relacionado con la expresión de las proteínas HLA, específicamente con la susceptibilidad y resistencia a tuberculosis pulmonar. Acorde a los resultados del estudio, se pudieron relacionar 2 alelos de susceptibilidad a la enfermedad en 3 y 9 de nuestros sujetos que poseían respectivamente los antígenos DRB1*11 y DRB1*16. También se identificaron DRB1*04, DQB1*02:01 y DQB1*04:02 en 9,

10 y 13 individuos, como aquellos relacionados con la resistencia al desarrollo de tuberculosis en mexicanos. Casi todos los alelos mencionados se expresaron de manera heterocigota.

Por otro lado, en torno a las frecuencias fenotípicas encontradas para los marcadores de grupos sanguíneos, coincide totalmente el hallazgo con lo reportado en la literatura en cuando al grupo “0” como marcador amerindio, puesto que casi todos los participantes contaban con este fenotipo (33 de 35 individuos).

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. Los participantes tienen un perfil genético heterogéneo entre el que se destacan componentes amerindios, sin embargo se identifican marcadores de origen africano, asiático y caucásico.

2. Considerando el hallazgo de haplotipos en bloques de 9 y 8 genes, como es el caso de A*02:06/B*40:02/C*03:04/DRB1*14:02/DRB3*01:01/DQA1*05:03/DQB1*03:01/DPA1*01:03/DPB1*03:01 y A*31:01/B*27:05/C*02:02/DRB1*08:02/DQA1*04:01/DQB1*04:02/DPA1*01:03/DPB1*04:01, respectivamente, así como un bloque conformado sólo por genes de clase II, DRB1*14:02/DQB1*03:01/DPB1*03:01, a quienes no se pudo designar con algún origen en particular, puede sugerirse que forman parte del perfil genético característico para el grupo poblacional en estudio, sin embargo se requieren análisis posteriores y en un grupo más extenso de individuos para

comprobarlo.

3. De los alelos más frecuentes encontrados en los participantes, no existe uno que pueda indicar ser exclusivo al grupo de personas en estudio, sin embargo se destaca su relación alélica y haplotípica con diversos grupos como los Havasupai y pimanos del suroeste de Estados Unidos, así como los mayos, seris y tarahumaras al norte de México.

4. Fueron identificados los alelos DRB1*14:02 y DQA1*04:01 como posibles ancestrales, debido a su hallazgo en poblaciones que sugieren el flujo del gen a través de migraciones por el puente de Beringia.

5. Los marcadores de grupo sanguíneo pudieron establecer una asociación entre su frecuencia fenotípica y el origen de los individuos en estudio.

CAPÍTULO VII. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 Limitaciones

La investigación en el tiempo comprende un año y medio, y se limitó a estudiar sólo algunas familias (con los integrantes voluntarios correspondientes) de una de las cuatro comunidades de la etnia kumiai del Estado de Baja California.

El estudio se limitó a precisar información molecular concerniente a familias involucradas, y el perfil epidemiológico es solamente de la comunidad de San José de la Zorra, por lo que los hallazgos no se pueden proyectar a las características de la etnia en general.

La investigación analiza únicamente 8 de los loci relacionados con los genes que codifican para los antígenos leucocitarios humanos: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1.

Los recursos financiados fueron en parte obtenidos por el apoyo del CONACyT, sin embargo se afirma la necesidad de haber recurrido a inversiones personales. La Institución a la cual se encuentra adscrito el estudio, carece de la Infraestructura para realizar todos los estudios moleculares, se realizaron en el Instituto Nacional de Medicina Genómica para utilizar instalaciones y el equipo necesario para la secuenciación génica.

7.2 Perspectivas

1. Realizar un estudio más amplio con miembros de las otras comunidades kumiai de la península y Estados Unidos, para aumentar la posibilidad de poder encontrar de manera más certera algún alelo y/o haplotipo característico y donde los resultados puedan ser generalizables.
2. Estudiar por lo menos dos generaciones de cada familia para estimar los cambios en frecuencias alélicas y genotípicas y así, poder valorar las predicciones establecidas por la ley Hardy-Weinberg.
3. Realizar un censo y estudio epidemiológico en las otras comunidades de la misma etnia para identificar condiciones fisiopatológicas de prevalencia, y que puedan ser asociadas a los hallazgos moleculares.
4. Realizar una asociación filogenética de los marcadores encontrados en la población kumiai con respecto a otros grupos amerindios, en particular con los que guardan una relación histórico-geográfica, para determinar su

cercanía biológica.

5. Realizar un estudio epidemiológico y caracterización genética HLA con etnias del mismo tronco lingüístico habitantes de la península bajacaliforniana como son kiliwa, paipai, cucapah, para identificar su asociación biológica con aquellas geográficamente cercanas; proponer estrategias que promuevan su desarrollo social y de salud para coadyuvar en la sobrevivencia de las comunidades y enriquecimiento cultural de nuestro país.

REFERENCIAS

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 8va ed. Pensilvania, U.S.A. Editorial Elsevier Saunders; 2015. Capítulo 6, Major Histocompatibility Complex Molecules and Antigen Presentation to T Lymphocytes; p.107-136.
2. Beck S, Geraghty D, Inoko H, Rowen L. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Nature 1999;401:921-923.
3. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering R, Broford E, Khodringar V, et al. Gene map of the extended Human MHC. Nat Rev Genet. 2004;5:889-899.
4. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering R, Broford E, Khodringar V, et al. Gene map of the extended Human MHC. Nat Rev Genet. 2004;5:889-899. Figure 1, Gene map of the extended major histocompatibility complex (xMHC); p.891.

5. Williams TM. Human Leukocyte Antigen Gene Polymorphism and the Histocompatibility Laboratory. *J Mol Diagn* 2001;3(3):98–104.
6. Instituto Europeo de Bioinformática [Página principal en internet]. Cambridge, UK; 2016 [Actualizada en julio de 2016; consultado 24 de julio de 2016]. Disponible en <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>
7. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol* 2013;31:443–473.
8. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol* 2013;31:443–473. Figure 1(a,c), Three-dimensional structure of MHC-I and MHC-II molecules with peptide ligands; p.444.
9. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 8va ed. Pensilvania, U.S.A. Editorial Elsevier Saunders; 2015. Capítulo 6, Major Histocompatibility Complex Molecules and Antigen Presentation to T Lymphocytes; p.107-136. Figure 6-14. Pathways of antigen processing and presentation; p.124.
10. Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol Rev.* 2011;240(1):11–24.
11. Herrera Paz EF. La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *Rev Med Hond* [Internet]. 2013 [citado el 27 de julio de 2016];81(1). Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Edwin_Francisco_Herrera-Paz/publication/260145736_LA_GENTICA_DE_POBLACIONES_Y_EL_ORIGEN_DE_LA_DIVERSIDAD_HUMANA/links/0046352fbf7a4e2d34000000.pdf
12. Sanchez-Mazas A, Meyer D. The Relevance of HLA Sequencing in Population Genetics Studies. *J Immunol Res* [internet]. 2014. [citado 18 abr 2015]; Disponible en: <http://0-search.proquest.com.millenium.itesm.mx/medline/docview/1552843616/fulltextPDF/2988545DAAB64715PQ/6?accountid=150554>

13. Hosomichi K, Jinam T, Mitsunaga S, Nakaoka H, Inoue I. Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing. BMC Genomics [internet]. 2013 [citado 2 may 2015];14(355):1-16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671147/pdf/1471-2164-14-355.pdf>
14. Ehrenberg PK, Geretz A, Baldwin KM, Apps R, Polonis VR, Robb ML, et al. High-throughput multiplex HLA genotyping by next-generation sequencing using multi-locus individual tagging. BMC Genomics [internet]. 2014 [citado 22 mar 2015];15:864. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4196003/pdf/12864_2014_Article_6530.pdf
15. Stoneking M. The human genome project and molecular anthropology. Genome Res. 1997;7(2):87–91.
16. Pugach I, Stoneking M. Genome-wide insights into the genetic history of human populations. Investig Genet [Internet]. Diciembre 2015 [citado el 30 de julio de 2016];6(1). Disponible en: <http://www.investigativegenetics.com/content/6/1/6>
17. Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, et al. Immunogenetics as a tool in anthropological studies. Immunology. Junio 2011;133(2):143–64.
18. Gorodezky C. Genetic difference between europeans and indians: Tissue and Blood Types. Allergy Proc. [internet]. Septiembre 1992 [citado 15 mar 2015];13(5):243-250. Disponible en: <http://0-search.proquest.com.millennium.itesm.mx/medline/docview/231733384/fulltextPDF/EA9A5764382D40CFPQ/1?accountid=150554>
19. Meyer D, Single RM, Mack SJ, Erlich HA, Thomson G. Signatures of Demographic History and Natural Selection in the Human Major Histocompatibility Complex Loci . Genetics. 2006; 173:2121-2142.

20. Fernandez-Viña M, Hollenbach JA, Lyke KE, Sztein MB, Maiers M, Klitz W, et al. Tracking human migrations by the analysis of the distribution of HLA alleles, lineages and haplotypes in closed and open populations. *Phil Trans R Soc.* 2012;367:820-829.
21. Yao Y, Shi L, Tao Y, Kulski JK, Lin K, Huang X, et al. Distinct HLA allele and haplotype distributions in four ethnic groups of China. *Tissue antigens.* Septiembre 2012; 80:452-461.
22. Alcoceba M, Marin L, Balanzategui A, Sarasquete ME, Chillón MC, Martín-Jiménez P, et al. Frequency of HLA-A, -B and DRB1 specificities and haplotypic associations in the population of Castilla y León (northwest-central Spain). *Tissue antigens.* Agosto de 2011;78:249-255.
23. Cano P, Testi M, Andreani M, Khoriaty E, Monsef JB, Gallucio T, et al. HLA population genetics: a Lebanese population. *Tissue antigens.* Julio 2012;80:341-355.
24. Farjadian S, Ota M, Inoko H, Ghaderi A. The genetic relationship among Iranian ethnic groups: an anthropological view based on HLA class II gene polymorphism. *Mol Biol Rep* [internet]. Sep 2009 [citado 18 abr 2015];36(7):1943-50. Disponible en: <http://0-search.proquest.com.millennium.itesm.mx/medline/docview/198475383/3950538B8E6941FFPQ/86?accountid=150554>
25. Yunis J, Yunis E, Yunis E. MHC Clase II haplotypes of colombian amerindian tribes. *Genet Mol Biol.* 2013;36(2):158-166.
26. Tu B, Leahy N, Yang R, Cha N, Kariyawasam K, Hou L, et al. Extensive haplotype diversity in African American mothers and their cord blood units. *Tissue Antigens* [internet]. 2013;81(1):28-34. [citado 27 jul 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3612350/pdf/nihms437885.pdf>
27. Juárez-Martín AI, González-Sobrino BZ, Olvera ÁEC, Falfán-Valencia R. HLA Class II Alleles in the Otomi Population of the Mezquital Valley: A Genetic

- Approach to the History of Interethnic Migrations in the Mexican Central Plateau. *Human Biology* [internet]. 2014 [citado 18 abr 2015];86(3):167-184. Disponible en: <http://0-search.proquest.com.millennium.itesm.mx/medline/docview/1666474305/fulltextPDF/3950538B8E6941FFPQ/16?accountid=150554>
28. Buhler S, Nunes JM, Nicoloso G, Tiercy J, Sanchez-Mazas A. The Heterogeneous HLA Genetic Makeup of the Swiss Population. *PLoS One* [internet]. Julio 2012 [citado 18 abr 2015];7(7). Disponible en: <http://0-search.proquest.com.millennium.itesm.mx/medline/docview/1327104201/fulltextPDF/3950538B8E6941FFPQ/6?accountid=150554>
 29. Arnaiz-Villena A, Moscoso J, Granados J, Serrano-Vela J, de IP, Reguera R, et al. HLA Genes in Mayos Population from Northeast Mexico. *Curr Genomics* [internet]. 2007;8(7):466-475. [citado 27 jul 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647159/pdf/CG-8-466.pdf>
 30. Mack SJ, Tu B, Yang R, Masaberg C, Ng J, Hurley CK. Human leukocyte antigen-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies in Americans originating from southern Europe: contrasting patterns of population differentiation between Italian and Spanish Americans. *Hum Immunol* [internet]. 2011;72(2):144-149. [citado 27 jul 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045865/pdf/nihms246688.pdf>
 31. Williams R, Chen YF, Endres R, Middleton D, Trucco M, Knowler W. Molecular variation of the HLA-A, B, C, DB1, DQA1, and DQB1 loci in full heritage american indians in Arizona: Private haplotypes and their evolution. *Tissue antigens*. Diciembre 2009;74(5):520-533.
 32. Balladares S, Alaez C, Pujol J, Duran C, Navarro JL, Gorodezky C. Distribution of TAP gene polymorphisms and extended MHC haplotypes in Mexican Mestizos and in Seri Indians from northwest Mexico. *Genes Immun* [internet]. 2002;3(2):78-85. [citado 27 jul 2014]. Disponible en:

<http://www.nature.com/gene/journal/v3/n2/pdf/6363835a.pdf>

33. Alaez C, Infante E, Pujol J, Duran C, Navarro JL, Gorodezky C. Molecular analysis of HLA-DRB1, DQA1, DQB1, DQ promotor polymorphism and extended class I/class II haplotypes in the Seri indians from Northwest Mexico. *HLA*. Mayo 2002;59(5):388-396.
34. Markow T, Hedrick PW, Zuerlein K, Danilovs J, Martin J, Vyvial T, et al. HLA polymorphism in the Havasupai: Evidence for balancing selection. *Am J Hum Genet*. Junio 1993;53:943-952.
35. Garduño E. Los grupos yumanos de Baja California: ¿indios de paz o indios de guerra? Una aproximación desde la teoría de la resistencia pasiva. *Estud front* [internet]. 2010 [citado 04 ago 2014];11(22):131-156 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53015788007>
36. Garduño E. En donde se mete el sol – Historia y situación actual de los indígenas montañeses de Baja California. México: Consejo Nacional para la Cultura y las Artes; 1994. Capítulo 1, De donde sale el sol. p.21-81.
37. Miskwish, MC. Kumeyaay: a history book. Estados Unidos: El Cajon CA Sycuan Press; 2007. Introduction.p.15-23.
38. Miskwish, MC. Kumeyaay: a history book. Estados Unidos: El Cajon CA Sycuan Press; 2007. Capítulo 1, Precontact. p.25-39.
39. Miskwish, MC. Kumeyaay: a history book. Estados Unidos: El Cajon CA Sycuan Press; 2007. Capítulo 2, The spanish incursión (1769-1822). p.41-61.
40. Miskwish, MC. Kumeyaay: a history book. Estados Unidos: El Cajon CA Sycuan Press; 2007. Capítulo 3, The mexican period (1822-1846). p.63-74.
41. Bendímez J. Antecedentes históricos de los indígenas de Baja California. *Estud Front*. Sep-Dic 1987;5(14):11-43.
42. Nolasco M. Conquista y dominación del Noroeste de México, el papel de los jesuitas. México: Instituto Nacional de Antropología e Historia; 1998.

Formaciones culturales en el noroeste de México a la llegada de los españoles.
p. 41-55.

43. Romero A. Los grupos prehispánicos de Baja California, a partir de su contacto con los jesuitas hasta su expulsión 1697-1768. Estudio comparativo de usos y costumbres entre cochimíes y kiliwas [Tesis doctoral]. [México]: Escuela Nacional de Antropología e Historia; 2006.
44. Ortega S. Un ensayo de historia, el Noroeste regional de México 1530-1850. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1993. Capítulo 1, La historia del Noroeste de México y su estudio. p.23-32.
45. Ortega S. Un ensayo de historia, el Noroeste regional de México 1530-1850. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1993. Capítulo 4, El dominio español en la primera mitad del siglo XVIII 1700-1767. p.71-93.
46. Emes M, Bendímez M. Raíces profundas, corazones ancestrales: María Emes Boronda, historia oral. 1era ed. México: Centro del INAH en Baja California; 2008. 117 p. Co-publicado por el Consejo Nacional para la Cultura y las Artes.
47. North A. The Native Tribes of Lower California. *American Anthropologist*. 1908;10(2): 236-250.
48. Censo general de población de comunidades. Instituto Nacional Indigenista-Universidad Autónoma de Baja California. 1992.
49. Morales P. Cultura y territorialidad: aportes etnológicos para la gestión ambiental comunitaria, estudio de caso, comunidad kumiai de San José de la Zorra (México). México: Abya Yala; 2003. p.77-89
50. Cuaderno de alternativas de desarrollo y retos del núcleo agrario: Ejido San José de la Zorra, Ensenada Baja California. México: Secretaría de la Reforma Agraria; 2012.

51. Tapia LA, Grijalva A. El imaginario colectivo kumiai y sus recursos naturales. *Estud front* [internet]. 2012 [citado 29 jul 2014];13(25):185-205. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/estfro/v13n25/v13n25a5.pdf>
52. Hohethal W, Blackburn T, Langdon M, Kronenfel D. *Tipai Ethnographic notes: a Baja California indian community at mid-century*. Novato: Ballena press; 2001. Capítulo 1, Historical background. p.1-21.
53. Hohethal W, Blackburn T, Langdon M, Kronenfel D. *Tipai Ethnographic notes: a Baja California indian community at mid-century*. Novato: Ballena press; 2001. Capítulo 3, Tribes, clans, and territories. p.37-65.
54. Wilken-Robertson M. *The US Mexican border environment: tribal environmental issues of the border region*. San Diego: San Diego State University Press; 2004. Chapter 2, Indigenous groups of México's northern border region. p.49-72.
55. Longstreth GF. *Baja California indian women's concept of illness and healing* [dissertation]. [San Diego]: San Diego State University; 2006. 80p.
56. Wilken-Robertson M. *The US Mexican border environment: tribal environmental issues of the border region*. San Diego: San Diego State University Press; 2004. Chapter 7, Association of gastrointestinal illnesses and environmental factors in a kumiai indian community in Baja California Mexico. p.171-195.
57. Argimon J, Jiménez J. *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. 4ta ed. Barcelona: Elsevier España S.L.; 2013. 402 p.
58. Issitt PD.: *Applied blood group serology*, 4th ed. Miami: Montgomery Scientific Publications, 1998.
59. *Manual técnico Maxwell 16 Blood DNA Purification System*. Wisconsin: Promega Corporation, 2013.

60. Gallagher SR, Desjardins, PR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in molecular biology*; 2006. 76:3D:A.3D.1–A.3D.21.
61. Qubit 2.0 Fluorometer Catalog. No. Q32866. MAN0003231. Invitrogen Life Technologies; October 2010.
62. Lo YMD, Chiu RWK. Next-generation sequencing of plasma/serum DNA: an emerging research and molecular diagnostic tool. *Clin Chem*. 2009;55:607-608.
63. Ehrenberg P, Geretz A, Baldwin K, Apps R, Polonis V, Robb M et al. High-throughput multiplex HLA genotyping by next-generation sequencing using multi-locus individual tagging. *BMC Genomics*. 2014; 15:8.

ANEXO 1. HISTORIA CLINICA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
 Facultad de Medicina y Psicología, campus Tijuana
 Facultad de Odontología, campus Tijuana

HISTORIA CLINICA
 Adulto

Número:

Nota:

Ficha de identidad, factores sociodemográficos	
Nombre:	<input type="text"/>
Comunidad:	San José de la Zorra, Ensenada B.C.
Edad: _____ Sexo: _____ Estado civil: _____ Estatura: _____ Peso: _____	
Grupo étnico: _____ Lugar de nacimiento: _____ Escolaridad: _____	
Ocupación*: _____ *Si es estudiante ¿En que nivel?	preescolar <input type="checkbox"/> primaria <input type="checkbox"/> secundaria <input type="checkbox"/> preparatoria <input type="checkbox"/> universidad <input type="checkbox"/>

Signos vitales	
Presión arterial: _____	Temperatura: _____
Pulso: _____	Respiración: _____

Antecedentes familiares fisiopatológicos			
¿Ha habido en la familia directa alguno de los siguientes padecimientos?			
Diabetes	<input type="checkbox"/>	Transtornos psiquiátricos	<input type="checkbox"/>
Tuberculosis	<input type="checkbox"/>	Alergias	<input type="checkbox"/>
Infarto del miocardio	<input type="checkbox"/>	Asma bronquial	<input type="checkbox"/>
Angina de pecho	<input type="checkbox"/>	Cáncer	<input type="checkbox"/>
Insuficiencia cardíaca	<input type="checkbox"/>	Artritis	<input type="checkbox"/>
Hipertensión	<input type="checkbox"/>	Otro(s), especifique	<input type="text"/>

Preguntas generales	
Si está tomando algún(os) medicamento(s) indicar cuáles:	<input type="text"/>
¿Alguna vez le han aplicado anestesia local?	Si* <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
* Describir si alguna vez tuvo una reacción negativa	<input type="text"/>
Si ha tenido algún problema serio o complicación por algún tratamiento previo de la boca o diente, describirlo:	<input type="text"/>

Antecedentes personales no patológicos			
Si fuma, ¿Con qué frecuencia lo hace?	Poco <input type="checkbox"/>	Ocasional <input type="checkbox"/>	Frecuente <input type="checkbox"/>
Si toma alcohol, ¿Con qué frecuencia lo hace?	Poco <input type="checkbox"/>	Ocasional <input type="checkbox"/>	Frecuente <input type="checkbox"/>
Si consume drogas, ¿Con qué frecuencia lo hace?	Poco <input type="checkbox"/>	Ocasional <input type="checkbox"/>	Frecuente <input type="checkbox"/>

Antecedentes personales patológicos	
Enfermedades que recuerda que ha padecido, ya sea de niño o de adulto:	
Si ha estado hospitalizado, indicar por qué:	
Si lo han operado, indicar la razón:	
Si le han transfundido sangre, indicar cuándo:	
Si es alérgico a alguna sustancia, indicar cuál:	
Si le han practicado algún examen médico, indicar cuándo y porqué:	
Si está siendo tratado de alguna enfermedad, indicar de cuál:	
Si está embarazada, indicar cuántos meses tiene:	

Interrogatorio general de aparatos y sistemas	
Describir si refiere algún malestar cardiovascular:	
Hematopoyético:	
Respiratorio:	
Gastrointestinal:	

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Introducción

Este documento de consentimiento puede tener palabras que usted no entienda. Por favor pídale al personal del estudio que le expliquen cualquier término o información que no comprenda.

A) Propósito del estudio

El objetivo de este estudio es saber si hay una relación entre la producción de unas moléculas (proteínas) llamadas antígenos HLA, el desarrollo de alguna enfermedad y la relación biológica con algunos otros grupos étnicos conocidos.

Estos antígenos HLA (llamado así por su significado en inglés, *Human Leucocyte Antigens*) son proteínas que están presentes en la superficie de algunas células de nuestro cuerpo y son parte de nuestro sistema inmune o sistema de defensa contra enfermedades. Los antígenos HLA son proteínas que están presentes en todas las personas, pero existen más de 3000 tipos de estos antígenos y eso hace que disminuya mucho la probabilidad de que dos personas tengan exactamente los mismos antígenos.

Si la frecuencia de un tipo particular de antígeno, por ejemplo el antígeno DRB1, es grande en enfermos con algún padecimiento en particular (y no está presente en personas sanas), se puede pensar que no es casualidad, que probablemente ese antígeno lo tienen en común las personas porque es un factor causante de la enfermedad o porque de alguna manera predisponga para que se presente. Otra información que se puede obtener del conocimiento de estas sustancias es la relación que existe entre algún otro grupo humano y el grupo o población que se esté estudiando. Si son las mismas o muy similares, se puede decir que estos grupos distintos están emparentados, estableciéndose una relación como se hace con los árboles familiares.

B) Procedimientos

En el transcurso de los tres primeros meses del estudio se establecerá contacto con todos los pacientes que participarán en el estudio, para informarles en qué consistirá, de qué forma se requiere su apoyo y la manera en que serán utilizados los datos que nos proporcionen.

En los seis meses subsecuentes se procederá a realizar los estudios de laboratorio correspondientes para determinar la clase de antígenos HLA que poseen los pacientes. Esto consiste en la extracción de DNA a partir de sus muestras sanguíneas obtenidas y aplicando algunas técnicas de biología molecular con equipo y material de laboratorio especial.

Los últimos meses serán dedicados a la interpretación de los datos y establecimiento de la relación que exista entre ellos, mediante análisis estadístico y aplicación de programas computacionales para su confirmación.

C) Riesgos y molestias

Los únicos malestares que puede presentar, son los relacionados con la extracción sanguínea (dolor en el área de punción), sin embargo el personal que hace esta intervención está totalmente calificado para realizarlo. Algunas veces se produce pérdida de conocimiento y de la sensibilidad debido a la suspensión súbita y momentánea de la acción del corazón, que en

general se presenta en algunas personas emotivas. En este último caso, si usted se acuesta por un momento, puede recuperarse rápidamente.

D) Beneficios

Usted y otros pacientes pueden beneficiarse de su participación en este estudio. El análisis que se establezca de las proteínas llamadas antígenos HLA le permite conocer la posibilidad de tener alguna enfermedad en un futuro, aunque no significa que si tiene esta posibilidad, la desarrollará. Pero es una información que le sirve para tomar las medidas necesarias para cuidarse mejor en relación a higiene, hábitos alimenticios y evitar algunos otros hábitos perjudiciales (alcoholismo, drogadicción y tabaquismo) que pueda desencadenar más fácilmente la enfermedad a la cual usted pudiese estar propenso.

E) Confidencialidad de la información e identidad del sujeto; revisión de registros

Estará permitido que representantes de la Facultad de Medicina y Psicología de la UABC y su comité de bioética, revisen los resultados arrojados de la encuesta y análisis sanguíneos.

Su identidad permanecerá confidencial a menos que la ley o autoridades reglamentarias requieran revelarla.

F) Pago por participar

No recibirá pago alguno por su participación en este estudio.

G) Lesiones relacionadas con la investigación

La única lesión que pudiese sufrir en este estudio, es un hematoma o moretón (acumulación de sangre debajo de la piel) durante la extracción sanguínea, en cuyo caso lo único que tendría que hacer es presionarse firmemente por unos momentos y aplicarse posteriormente una compresa fría en el área de punción.

H) Contacto para preguntas acerca del estudio y derechos del sujeto.

Si tiene preguntas referentes a este estudio sobre sus derechos como participantes, o si ha experimentado alguna lesión relacionada con la investigación, puede llamarle a la siguiente persona para que lo oriente:

M.C. Brenda Linda Alvarado Espinoza
Facultad de Medicina y Psicología
Tel. Facultad de Medicina y Psicología (664) 979 75 05, ext.55301
Facultad de Odontología (664) 682 72 92
Correo electrónico: alvarado@uabc.edu.mx

I) Participación voluntaria y condiciones de abandono

Su participación en este estudio es voluntaria. Podrá rechazar participar en este estudio o abandonarlo en cualquier momento sin sanción o pérdida de beneficios a los que, de otro modo, tendría derecho. Su médico o usted pueden solicitar que los datos obtenidos mediante la información que usted proporcionó o la que arrojó el análisis de sangre no sean utilizados posteriormente.

J) Costos adicionales que puede incurrir el sujeto

Como participante en este estudio no incurrirá en gastos adicionales. La encuesta se entregará de manera gratuita para que la conteste y los análisis que se hagan de su sangre serán también sin costo alguno para usted.

K) Información de nuevos hallazgos que pueda hacer cambiar la decisión de continuar en el estudio.

Si usted considera que la información que se obtenga de su encuesta o análisis de sangre lo perjudica de alguna manera o simplemente no desea que se continúe utilizando en el transcurso del estudio, usted puede solicitar descartar esos datos del análisis que los investigadores realicen.

L) Número aproximado de sujetos en el estudio
Aproximadamente 50 indígenas kumiai.

M) Duración de la investigación

El estudio tendrá una duración de un año aproximadamente, pero la participación de usted será solo al inicio en el transcurso de las visitas para explicarle el propósito del proyecto, para realizar este procedimiento de consentimiento informado, para aplicarle una encuesta y realizar la extracción de la muestra sanguínea.

CONSENTIMIENTO

Yo, _____, he leído y comprendido la información anterior que describe este estudio, y mis preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción. Estoy de acuerdo en participar en este estudio. Al firmar esta forma, no renuncio a mis derechos legales. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del paciente/Padre/Tutor/Representante

Fecha de firma

Nombre y firma de la persona que explicó el consentimiento

Fecha de firma

Nombre y firma del testigo 1

Fecha de firma

Nombre y firma del testigo 2

Fecha de firma

ANEXO 3. CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Tijuana, Baja California a ____ de _____ de 2015

Sr(a). XXXXXX

Por este medio me permito ofrecerle un cordial saludo y notificarle las condiciones de confidencialidad del estudio clínico donde usted es participante.

El proyecto denominado "Diversidad genética de una comunidad autóctona de Baja California, en el marco del Complejo Principal de Histocompatibilidad" es un estudio a mediano plazo donde se analizarán muestras sanguíneas de distintos individuos incluyendo las de usted. Las muestras serán identificadas con dígitos numéricos y caracteres alfanuméricos, por lo que su nombre no será utilizado en el proceso del estudio, sino que solamente se registrará en la base de datos (junto con el número de identificación que se le asigne) que los investigadores tendrán con el propósito de correlacionarlo con los hallazgos. De igual forma en esa base de datos se incluirá su número de telefónico y/o correo electrónico, además de otros que estarán incluidos en una encuesta que usted responderá como primer paso al procedimiento del estudio clínico. El investigador que le hará preguntas será el mismo que manejará la base de datos. No se divulgarán sus datos personales (nombre, teléfonos, dirección postal y electrónica) a instituciones ajenas al estudio, es decir, que no sea la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) o el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Sus resultados se manejarán manualmente (en el cuadernillo de registros del investigador) o digitalmente como respaldo, en una computadora. Los hallazgos que genere el estudio serán sometidos a publicación en una revista de divulgación científica, sin embargo se reitera que no se manejarán nombres, sino códigos alfanuméricos de identificación e instituciones de salud de procedencia.

De esta manera, yo, Brenda Linda Alvarado Espinoza, manifiesto que me obligo a mantener de manera confidencial la información a la que tenga acceso, quedando consciente de ser sancionada según las leyes penales correspondientes al violar este convenio. Adicionalmente deslindo a la Universidad Autónoma de Baja California de cualquier responsabilidad a consecuencia de su falta de cumplimiento.

Sin más por el momento y esperando su conformidad ante estos principios de privacidad, quedo de usted como su S.S.

Atentamente



QFB Brenda Linda Alvarado Espinoza
Cédula profesional: 6172050

ANEXO 4. PRINCIPIOS DE DECLARACION DE HELSINKI

Principios de la declaración de Helsinki

Principios básicos

1. La investigación biomédica que implica a personas debe concordar con los principios científicos aceptados universalmente y debe basarse en una experimentación animal y de laboratorio suficiente y en un conocimiento minucioso de la literatura científica.
2. El diseño y la realización de cualquier procedimiento experimental que implique a personas debe formularse claramente en un protocolo experimental que debe presentarse a la consideración, comentario y guía de un comité nombrado especialmente, independientemente del investigador y del promotor, siempre que este comité independiente actúe conforme a las leyes y ordenamientos del país en el que se realice el estudio experimental.
3. La investigación biomédica que implica a seres humanos debe ser realizada únicamente por personas científicamente cualificadas y bajo la supervisión de un facultativo clínicamente competente. La responsabilidad con respecto a las personas debe recaer siempre en el facultativo médicamente cualificado y nunca en las personas que participan en la investigación, por mucho que éstas hayan otorgado su consentimiento.
4. La investigación biomédica que implica a personas no puede llevarse a cabo lícitamente a menos que la importancia del objetivo guarde proporción con el riesgo inherente para las personas.
5. Todo proyecto de investigación biomédica que implique a personas debe basarse en una evaluación minuciosa de los riesgos y beneficios previsible tanto para las personas como para terceros. La salvaguarda de los intereses de las personas deberá prevalecer siempre sobre los intereses de la ciencia y la sociedad.
6. Debe respetarse siempre el derecho de las personas a salvaguardar su integridad. Deben adoptarse todas las precauciones necesarias para respetar la intimidad de las personas y reducir al mínimo el impacto del estudio sobre su integridad física y mental y su personalidad.
7. Los médicos deben abstenerse de comprometerse en la realización de proyectos de investigación que impliquen a personas a menos que crean fehacientemente que los riesgos involucrados son previsible. Los médicos deben suspender toda investigación en la que se compruebe que los riesgos superan a los posibles beneficios.

8. En la publicación de los resultados de su investigación, el médico está obligado a preservar la exactitud de los resultados obtenidos. Los informes sobre experimentos que no estén en consonancia con los principios expuestos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.
9. En toda investigación en personas, cada posible participante debe ser informado suficientemente de los objetivos, métodos, beneficios y posibles riesgos previstos y las molestias que el estudio podría acarrear. Las personas deben ser informadas de que son libres de no participar en el estudio y de revocar en todo momento su consentimiento a la participación. Seguidamente, el médico debe obtener el consentimiento informado otorgado libremente por las personas, por escrito.
10. En el momento de obtener el consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación, el médico debe obrar con especial cautela si las personas mantienen con él una relación de dependencia o si existe la posibilidad de que consientan bajo coacción. En este caso, el consentimiento informado debe ser obtenido por un médico no comprometido en la investigación y completamente independiente con respecto a esta relación oficial.
11. En el caso de incompetencia legal, el consentimiento informado debe ser otorgado por el tutor legal en conformidad con la legislación nacional. Si una incapacidad física o mental imposibilita obtener el consentimiento informado, o si la persona es menor de edad, en conformidad con la legislación nacional la autorización del pariente responsable sustituye a la de la persona. Siempre y cuando el niño menor de edad pueda de hecho otorgar un consentimiento, debe obtenerse el consentimiento del menor además del consentimiento de su tutor legal.
12. El protocolo experimental debe incluir siempre una declaración de las consideraciones éticas implicadas y debe indicar que se cumplen los principios enunciados en la presente Declaración.

Investigación médica combinada con asistencia profesional (Investigación clínica)

1. En el tratamiento de una persona enferma, el médico debe tener la libertad de utilizar un nuevo procedimiento diagnóstico o terapéutico, si a juicio del mismo ofrece una esperanza de salvar la vida, restablecer la salud o aliviar el sufrimiento.

2. Los posibles beneficios, riesgos y molestias de un nuevo procedimiento deben sopesarse frente a las ventajas de los mejores procedimientos diagnósticos y terapéuticos disponibles.
3. En cualquier estudio clínico, todo paciente, inclusive los de un eventual grupo de control, debe tener la seguridad de que se le aplica el mejor procedimiento diagnóstico y terapéutico confirmado.
4. La negativa del paciente a participar en un estudio jamás debe perturbar la relación con su médico.
5. Si el médico considera esencial no obtener el consentimiento informado, las razones concretas de esta decisión deben consignarse en el protocolo experimental para conocimiento del comité independiente (v. Principios básicos, punto 2).
6. El médico podrá combinar investigación médica con asistencia profesional, con la finalidad de adquirir nuevos conocimientos médicos, únicamente en la medida en que la investigación médica esté justificada por su posible utilidad diagnóstica o terapéutica para el paciente.

**Investigación biomédica no terapéutica que implique a personas
(Investigación biomédica no clínica)**

1. En la aplicación puramente científica de la investigación médica realizada en personas, es deber del médico seguir siendo el protector de la vida y la salud de la persona participante en la investigación biomédica.
2. Las personas participantes deben ser voluntarios, o bien personas sanas o pacientes cuya enfermedad no esté relacionada con el protocolo experimental.
3. El investigador o el equipo investigador debe suspender la investigación si estimasen que su continuación podría ser dañina para las personas.
4. En investigaciones en hombre, el interés de la ciencia y la sociedad jamás debe prevalecer sobre consideraciones relacionadas con el bienestar de las personas.

ANEXO 4. TRABAJO DERIVADO DE LA INVESTIGACIÓN



Human Immunology

Volume 77, Supplement, September 2016, Pages 107

The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics: 42nd Annual Meeting Abstracts September 26 – 30, 2016 Hyatt Regency St. Louis at the Arch, St. Louis, Missouri



P094 Human leukocyte antigen characterization of a Kumeyaay ethnic group community in Baja California, Mexico

Brenda L. Alvarado^a, Karol Carrillo^b, Horacio Almanza^a, Hilario Flores^c, Carmen Alaez^d

^a Autonomous University of Baja California, Medicine and Psychology, Tijuana, Mexico

^b National Institute of Genomic Medicine, Translational Medicine, Mexico, Mexico

^c Diagnostic and Epidemiologic Reference National Institute, Immunology, México, D.F., Mexico

^d National Institute of Genomic Medicine, Translational Medicine, México, D.F., Mexico

Available online 31 August 2016

[Show less](#)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2016.07.159>

[Get rights and content](#)

The Kumeyaay Nation is part of the Yuman cultural complex. It is disseminated along the states of Arizona and California in the USA, as well as the states of Baja California and Sonora in Mexico. San Jose de la Zorra is one of the four native Kumeyaay communities in Baja California, with a population of around 200 people. The HLA class I and II profile has not been previously explored for them. The aim of this study was to obtain high-resolution HLA class I and class II typing for a group of Kumeyaay persons from San Jose de la Zorra.

Methods

The study was performed in 35 individuals belonging to nine families. All of them agreed to participate and sign an informed consent. DNA was extracted from peripheral blood using Maxwell 16. HLA high-resolution typing was performed through NGS using the TruSight HLA kit and the Miseq, Illumina. The sequence analysis was done with the Assign software. Allele and haplotype frequencies were calculated from “less related individual” (HLA-net.eu).

Results

A total of 28 different haplotypes were identified. Nine of them were from a European or African origin. The allele profile found in Amerindian haplotypes was very restricted, with two or three alleles in each locus adding around 50–60% of the total. The most frequent alleles in each locus were: A* 02:06, * 68:01, * 31:01; B* 40:02, * 27:05, * 35:01; C* 03:04, * 02:02, * 04:01, DRB1* 14:02, * 08:02, * 16:02; DQB1* 03:01, * 04:02 and DPB1* 04:01, * 04:02.

Conclusions

A very restricted HLA class I and II allele profile was found in Kumeyaay, similar to what has been described for other Amerindian populations. The allele profile is very different from the one found in Seris, that also live in the northwest of Mexico, but belong to a different linguistic trunk. For example in Seris B* 27:05 & DRB1* 14:02 are almost absent. The presence of 25% of non-Amerindian haplotypes can be explained, partially, as the result of admixture with Spaniard and English migrants that arrived at the peninsula in the 1800s.

ELSEVIER

About ScienceDirect Remote access Shopping cart
Contact and support Terms and conditions Privacy policy

Cookies are used by this site. For more information, visit the [cookies page](#).

Copyright © 2016 Elsevier B.V. or its licensors or contributors. ScienceDirect ® is a registered trademark of Elsevier B.V.

 RELX Group™

