

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



FRECUENCIAS ALELICAS DE TRES MARCADORES
GENETICOS POLIMORFICOS EN UNA MUESTRA DE
LA POBLACION DEL NORESTE DE MEXICO

Por

Q.C.B. MARIA DEL CARMEN VILLALOBOS TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

Septiembre, 1999



1080095014

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



FRECUENCIAS ALELICAS DE TRES MARCADORES
GENETICOS POLIMORFICOS EN UNA MUESTRA DE
LA POBLACION DEL NORESTE DE MEXICO.

Por

Q.C.B. María del Carmen Villalobos Torres

Como requisito parcial para obtener el Grado
de MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

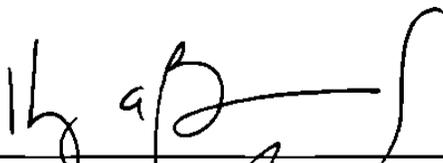
Septiembre, 1999

QH431
.V5



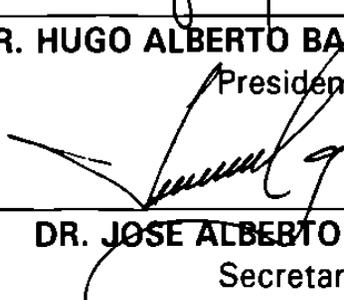
**FRECUENCIAS ALELICAS DE TRES MARCADORES GENETICOS
POLIMORFICOS EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION DEL
NORESTE DE MEXICO**

Aprobación de la Tesis:



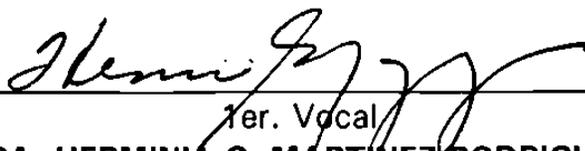
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA

Presidente



DR. JOSE ALBERTO GARZA LEAL

Secretario



1er. Vocal

DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ



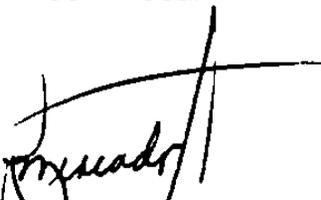
DRA. LILIA CARDENAS IBARRA

2do. Vocal



DR. VÍCTOR M. RIOJAS VALDEZ

3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA

Subdirector

de Investigación y Estudios de Posgrado

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Medicina Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

DEDICATORIA

Ante todo a Dios por hacerse presente siempre en mi vida y ser en todo momento, fuente de sabiduría, fortaleza y amor.

*A mis padres: Reynaldo G. Villalobos Barrera y Consuelo Torres Esqueda.
Gracias por su amor, apoyo incondicional y por procurar siempre mi felicidad y la de mis niños.*

A mis hermosos hijos:

Luis Daniel y Diego Manuel, lo más valioso para mí.

Gracias por sus travesuras, por lo que he aprendido de ustedes, por sus sonrisas, sus abrazos, que siempre atesoraré mi corazón.

A Luis Enrique Alvidrez Quihui, por todo lo que hemos vivido, bueno y malo. Y por lo que nos quede pendiente.

Gracias mil por tu apoyo, comprensión, amor y por dejarme ser una mujer completa y auténticamente libre.

*A todos mi cariño
Mary*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo A. Barrera por brindarme la oportunidad de superarme y formar parte de su distinguido grupo de trabajo.

Al MC Ricardo Cerda, por su gran apoyo y ayuda para la realización de este trabajo, principalmente en la parte estadística y de recolección de muestras.

A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez, por sus consejos y paciencia.

A mis amigos de Venezuela, Lennie Pineda y Lisbeth Borjas. Y de Colombia, el Dr. Carlos Martín Restrepo, por su valiosa ayuda al principio de este trabajo y por la linda amistad de siempre.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A mis hermanos Verónica, Reynaldo y Rolando por la grata convivencia del pasado, presente y futuro.

A toda mi familia en Cananea, Sonora por todo el afecto que recibimos a pesar de la distancia.

En especial a mi suegra Lic. Ana Elia Quihui Borbón por todo su cariño, sus consejos y por cuidarme como a una hija.

A mis compañeros y amigos de la generación 95-97: Celia, Hugo, Ana, Claudio y Mario (pollito) por el tiempo que compartimos, disfrutamos y sufrimos juntos en la aventura de nuestra maestría, por siempre serán recordados.

A mi amiga QCB Sandra Galván Duval, porque nuestra amistad ha perdurado a través del tiempo y hoy trasciende a nuestros hijos. A su esposo, Dr. Mario R. Alcorta por sus atenciones hacia mis niños, desde muy pequeños.

A mis amigas Celia, Norma y Martha por escucharme y sostenerme con su amistad en momentos difíciles.

A mis amigos Fermín y Claudio, por su gentil ayuda y convivencia.

Al personal del Departamento de Bioquímica, a todos gracias por sus atenciones.

A todos mis amigos verdaderos de la ULIEG.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	
1.1 El DNA y su estudio en los individuos.....	1
1.1.1 El DNA base de la herencia.....	1
1.1.2 Genética de poblaciones.....	2
1.1.3 Genes en poblaciones humanas.....	2
1.1.4 Diversidad genética entre individuos.....	3
1.1.4.1 Identificación de individuos.....	4
1.2 Polimorfismos Genéticos.....	4
1.2.1 Usos de los polimorfismos en Genética.....	5
1.2.2 Polimorfismos a nivel del DNA.....	6
1.2.2.3 Regiones Hipervariables.....	6
1.2.2.4 Microsatélites o STRs.....	7
1.2.2.5 Minisatélites o VNTR's.....	8
1.2.2.6 Análisis multi-locus.....	8
1.2.2.7 Perfiles unilocus.....	9
1.2.2.8 Tipificación de VNTRs por PCR.....	10
1.3 El marcador genético Apo B.....	11
1.3.1 El gen ApoB.....	11
1.3.2 Minisatélite 3' en el gen Apo B.....	12
1.4 El marcador genético D1S80.....	13
1.4.1 El minisatélite D1S80.....	13
1.4.2 Análisis de D1S80 por Amp-FLPs.....	13
1.4.3 Utilidad de D1S80.....	14
1.5 El marcador genético HLADQA1.....	15

Capítulo	Página
1.5.1	El Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....15
1.5.2	Estudio genético HLA.....17
1.5.3	Análisis molecular de los genes de clase II (HLAD.....17
1.5.3.1	Hibridación alelo específica de HLADQA1.....18
1.6	Justificación.....19
1.7	Objetivos.....20
1.7.1	Objetivo General.....20
1.7.2	Objetivos específicos.....20
2.	MATERIALES Y METODOS.....21
2.1	Area de trabajo, reactivos y equipo.....21
2.1.1	Area de trabajo.....21
2.1.2	Material biológico.....21
2.1.3	Reactivos químicos.....21
2.1.4	Material.....23
2.1.5	Equipo.....23
2.1.6	Apoyo computacional.....23
2.2	Estrategia experimental general.....25
2.3	Métodos.....26
2.3.1	Estudio de los marcadores genéticos
DIS80, Apo B y HLADQA1.....26	
2.3.1.1	Marcador genético Apo B.....26
2.3.1.1.1	Optimación de las condiciones
de amplificación.....26	
2.3.1.1.2	Amplificación de las muestras para el
marcador Apo B.....27	
2.3.1.1.3	Verificación de la amplificación en
gel de agarosa.....28	
2.3.1.1.4	Resolución de los fragmentos amplificados.....29
2.3.1.1.5	Análisis de imagen y tipificación
de alelos Apo B.....30	

Capítulo	Página
2.3.1.2 Marcador genético D1S80.....	32
2.3.1.2.1 Optimación de las condiciones de amplificación.....	32
2.3.1.2.2 Amplificación de las muestras con el marcador D1S80.....	33
2.3.1.2.3 Verificación de la amplificación en gel de agarosa.....	33
2.3.1.2.4 Resolución de los fragmentos amplificad.....	34
2.3.1.2.5 Análisis de los patrones electroforéticos y tipificación.....	34
2.3.1.3 Marcador genético HLADQA1.....	35
2.3.1.3.1 Amplificación de las muestras con el Marcador HLADQA1.....	35
2.3.1.3.2 Verificación de la amplificación.....	35
2.3.1.3.3 Tipificación por hibridación reversa en mancha.....	36
2.3.2 Muestra analizada y obtención de DNA.....	37
2.3.2.1 Muestra analizada.....	37
2.3.2.2 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre.....	38
2.3.2.3 Verificación de la calidad y la concentración del DNA...38	
2.3.3 Análisis estadístico de los resultados.....	39
2.3.3.1 Frecuencia Alélica.....	39
2.3.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	39
2.3.3.3 Nivel de significancia.....	39
2.3.3.4 Heterocigosidad.....	39
2.3.3.5 Poder de Discriminación (PD).....	40
2.3.3.6 Probabilidad de Coincidencia al azar.....	40

Capítulo	Página
3. RESULTADOS.....	41
3.1 Marcador Genético Apo B.....	41
3.1.1 Optimación de la reacción de PCR.....	41
3.1.2 Amplificación de las muestras.....	42
3.1.3 Estadísticas para el marcador Apo B.....	44
3.2 Marcador genético D1S80.....	47
3.2.1 Optimación del PCR.....	47
3.2.2 Amplificación de muestras.....	47
3.2.3 Tipificación.....	49
3.2.4 Análisis estadístico de D1S80.....	50
3.3 Marcador genético HLADQA1.....	52
3.3.1 Amplificación de las muestras por PCR.....	52
3.3.2 Tipificación por hibridación reversa en mancha.....	52
3.3.3 Análisis estadístico de HLADQA1.....	54
4. DISCUSION.....	56
4.1 Tipificación de los marcadores genéticos Apo B, D1S80 y HLADQA1.....	56
4.2 Marcador genético Apo B.....	58
4.3 Marcador genético D1S80.....	61
4.4 Marcador genético HLADQA1.....	63
4.5 Utilidad de los marcadores D1S80, Apo B y HLADQA1.....	64
5. CONCLUSIONES.....	67
6. BIBLIOGRAFIA.....	69
Apéndice.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Amplificación de polimorfismos de DNA por PCR.....	11
2. Esquema de la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	16
3. Estrategia experimental general.....	26
4. Ejemplo de la tipificación de Apo B.....	31
5. Titulación de la concentración de DNA en la PCR para Apo B	42
6. Genotipificación de Apo B.....	43
7. Gel de poliacrilamida para la resolución de los fragmentos amplificados de Apo B en 13 individuos.....	44
8. Frecuencias alélicas encontradas del marcador Apo B en los individuos analizados	45
9. Titulación del ión magnesio en la amplificación de D1S80 por PCR.....	48
9. Amplificación del marcador genético D1S80 a partir del DNA de 10 individuos.....	48
11. Tipificación de D1S80.....	49
12. Frecuencias alélicas del marcador D1S80 en los individuos analizados.....	50
13. Tipificación con el estuche del marcador HLADQA1.....	53
14. Frecuencias alélicas del marcador HLADQA1 en los individuos analizados.....	54
15. Frecuencias alélicas del marcador genético Apo B en una población africana.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Reacción de PCR para el marcador genético Apo B.....	28
2. Condiciones de amplificación para Apo B.....	28
3. Preparación del gel discontinuo de poliacrilamida.....	30
4. Reacción de PCR para el marcador genético D1S80.....	33
5. Condiciones de amplificación para D1S80.....	34
6. Reacción de PCR para HLADQA1.....	35
7. Condiciones de amplificación para HLADQA1.....	36
8. Frecuencias genótípicas (%) para el marcador Apo B encontrados en la muestra estudiada.....	46
9. Números de los diferentes genotipos Apo B encontrados.....	46
10. Frecuencias genótípicas (%) del marcador D1S80 encontrados en la muestra estudiada.....	51
11. Números de los diferentes genotipos D1S80 encontrados.....	51
12. Frecuencias genótípicas (%) del marcador HLADQA1 en la muestra estudiada.....	55
13. Números de los diferentes genotipos HLADQA1 encontrados.....	55
14. Tipificación del marcador Apo B en diferentes poblaciones.....	58
15. Frecuencias alélicas en por ciento para el marcador D1S80 en diferentes poblaciones.....	62

16.	Frecuencias alélicas en por ciento para el marcador HLADQA1 en Poblaciones hispanas.....	64
17.	Pruebas para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg.....	65
18.	Parámetros de utilidad de los marcadores D1S80, Apo B y HLADQA1.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AmpFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
ApoB	Apolipoproteína B
ApoB-100	Apolipoproteína B-100
ApoB-48	Apolipoproteína B-48
C	Citosina
DNAc	DNA complementario
D1S80	VNTR D1S80
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxiribonucleosidos trifosforados
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
Fig.	Figura
G	Guanina
h	Heterocigosidad
HLADQA1	Gen DQA1 del complejo HLA
HVR	Región hipervariable
kDa	Kilodaltones
M	Concentración Molar
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Concentración milimolar
ng	Nanogramo
nuc	Nucleótidos
°C	Grados Centígrados
p	Brazo corto de un cromosoma
PCA	Probabilidad de Coincidencia al Azar
PD	Poder de Discriminación
PE	Poder de Exclusión
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

pg	Picogramos
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
pol.	Polimerasa
q	Brazo largo de un cromosoma
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril sulfato de sodio
STR	Repeticiones cortas en tandem
T	Timina
TMB	Tetrametilbencidina
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VNTR	Repeticiones en tandem de número variable
Vol.	Volumen
X	Veces la concentración
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Concentración micromolar

RESUMEN

Ma. del Carmen Villalobos Torres

Fecha de Graduación: septiembre, 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: FRECUENCIAS ALÉLICAS DE TRES MARCADORES GENÉTICOS POLIMÓRFICOS EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.

Número de páginas: 80

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Area de Estudio: Genética Molecular de Poblaciones.

Propósito y Método de Estudio: En Genética, los marcadores polimórficos a nivel de DNA constituyen una herramienta poderosa para distinguir a los individuos. Los alelos particulares o combinaciones de dichos marcadores genéticos son únicos para un individuo, pero representan las cualidades genéticas del grupo poblacional al que pertenece. Es por ello importante conocer las frecuencias de los diferentes alelos de dichos marcadores en una población determinada, para así identificar los marcadores más informativos para cada población.

En este trabajo se determinaron en una muestra de 103 individuos del Noreste de México, las frecuencias alélicas y genotípicas de tres marcadores genéticos polimórficos, dos minisatélites: Apo B y D1S80 y uno de secuencia codificante: HLADQA1. A partir del DNA recuperado de sangre venosa periférica de cada individuo, se amplificó cada marcador genético mediante PCR. Los fragmentos amplificados de los minisatélites se resolvieron por electroforesis vertical en geles discontinuos de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio y se analizaron con un equipo de fotodocumentación. El marcador HLADQA1, se tipificó mediante hibridación reversa en mancha del producto amplificado con sondas oligo-alelo específicas, utilizando un estuche comercial.

Contribuciones y Conclusiones:

Los resultados obtenidos para cada marcador en este trabajo se resumen a continuación:

Apo B: se encontraron 16 alelos diferentes, siendo los más frecuentes el de 37 (23.301%) y el de 39 repeticiones (27.670). Además, se detectaron 44 genotipos diferentes: 41 heterocigotos y 3 homocigotos, resultando el más frecuente el 37/39 (15.53%), seguido del 39/39 (7.77). Los parámetros de utilidad de este marcador son: Heterocigosidad (h) del 84%, Poder de Discriminación (PD) del 95.1% y Poder de Exclusión (PE) del 70.08%.

D1S80: se encontraron 20 alelos diferentes, siendo los más frecuentes el de 18 (23.301%) y el de 24 (20.388) repeticiones. Se detectaron 53 genotipos diferentes, resultando el más frecuente el 18/24 (9.71%), seguido por el 24/24 (5.83%). Los parámetros de utilidad de este marcador son: h= 87.0%, PD= 96.7% y PE= 75.4%.

HLADQA1: se encontraron 6 alelos diferentes, siendo el alelo 4 el más frecuente (38.35%). Se detectaron 18 genotipos diferentes, encontrándose como más frecuente al 3,4 (20.39%). Los parámetros de utilidad de este marcador son: h= 76.0%, PD= 89.6% y PE= 54.42%.

Los tres marcadores estudiados resultaron polimórficos y en equilibrio de Hardy-Weinberg. En forma conjunta tienen un poder de exclusión del 96.64% y un PCA de 1.9×10^6 . Aunque en sí mismos estos marcadores son de gran utilidad en pruebas de identificación de individuos, es conveniente utilizar otros marcadores junto con ellos, para aumentar los valores de PE y PCA de las pruebas de identificación de individuos.

FIRMA DEL ASESOR:

