

63  
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

POLIMORFISMO MOLECULAR DE GENES CLASE I  
DEL MHC EN UNA POBLACION AISLADA:  
LOS SERIS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**P R E S E N T A :**

**EDUARDO DAVID / INFANTE MONTAÑO**



MEXICO, D. F.



264639

1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Polimorfismo molecular de genes clase I del MHC en una  
población aislada: Los Seris

Tesis

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Eduardo David Infante Montaña

México, D.F

1998

**Jurado Asignado:**

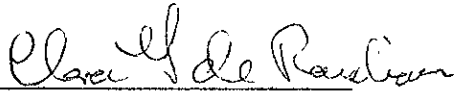
Presidente: Prof. Gerardo Kono Yaico  
Vocal: Prof. Saturnino de León Chapa  
Secretario: Dra. Clara Gorodezky  
1er. Suplente: Prof. Fernando García Tamayo  
2º. Suplente: Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Inmunogenética,  
Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos,  
Secretaría de Salud


**Asesor:**

Dra. Clara Gorodezky Lauferman

  
\_\_\_\_\_

**Sustentante:**

Eduardo David Infante Montaña

  
\_\_\_\_\_

# Agradecimientos

---

A la Dra. Clara Gorodezky, por todo el apoyo y empuje brindados y el gran esfuerzo desplegado para la realización de esta tesis y como reconocimiento en su labor de formación de investigadores.

A mis compañeros en el Laboratorio de Biología Molecular por sus enseñanzas y ayuda:

Angélica Olivo

Carmen Alaez

Héctor Debaz

Miriam Nohemí Vázquez

Ana Isabel Burguete

Arturo Hernández

Mónica Moreno

Sandra Balladares

Dolores Gómez Toxqui

Elva Leticia Pérez Luque

Al personal del Laboratorio de Salud Pública del Estado de Sonora MJ Pujol, C. Duran, JL Navarro, por habernos proporcionado las muestras.

Al Dr. Derek Middleton y a Fionnuala Williams del Laboratorio Regional de Tipificación de Tejidos de Irlanda del Norte, por habernos proporcionado las sondas e iniciadores para la tipificación. Al Dr. Middleton especialmente por su asesoría, apoyo, la tipificación ciega de controles y por el apoyo en el control de calidad.

## Dedicatorias

---

A mis padres, a quienes responsabilizo de todo lo bueno que me ha pasado, que de lo malo la culpa sólo alcanza para mi.

A la doctora Clara, porque aunque las espuelas dejan marcas, a final de cuentas nos hacen llegar al destino.

A mis sobrinos Feri y Alex, con esperanza en el futuro.

A Sandra.

A Claudine, Ricardo, Pacheco, Ingrid, Itzel, Manuel, Lourdes, Angel, Diana y demás truhanes de la Facultad, con la seguridad de que en donde estén no pasarán desapercibidos.

A mis padres, mi hermana, mis amigos y maestros, y todos aquellos con los que he convivido y de los que he aprendido, porque ésta es también su obra

# Índice

---

<b>I. Abreviaturas</b>	<b>4</b>
<b>II. Resumen</b>	<b>5</b>
<b>III. Introducción</b>	<b>8</b>
1. <i>El Complejo Principal de Histocompatibilidad</i>	8
a. Descubrimiento	8
b. Organización genética del MHC	9
c. Estructura y función	13
d. Procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas HLA clase I	18
e. Nomenclatura	24
f. Polimorfismo del MHC	25
g. Significado biológico y evolución del polimorfismo en clase I	30
2. <i>Estructura genética de las poblaciones amerindias</i>	33
a. Los Seris	36
3. <i>Análisis basados en la reacción de PCR</i>	39
a. Tipificación mediante iniciadores secuencia específicos (PCR-SSP)	40
b. Tipificación mediante mutaciones refractarias (PCR-ARMS)	41
c. Tipificación con sondas de oligonucleótidos (PCR-SSOP)	42
<b>IV. Objetivos</b>	<b>45</b>
a. Objetivo general	45
b. Objetivos particulares	45
<b>V. Hipótesis</b>	<b>46</b>
<b>VI. Métodos</b>	<b>47</b>
1. <i>Población estudiada</i>	47
2. <i>Toma de muestras</i>	47
3. <i>Obtención de DNA a partir de sangre periférica</i>	47
4. <i>Tipificación de los loci HLA-A y HLA B mediante PCR-SSOP</i>	51
a. Amplificación del DNA por PCR	51
b. Elaboración del Dot-Blot	53

c.	Marcaje de los oligonucleótidos	54
d.	Prehibridación e hibridación	55
e.	Exposición y revelado	56
f.	Deshibridación	56
5.	<i>Tipificación mediante PCR-ARMS / PCR-SSP para el locus HLA-A</i>	63
a.	Amplificación del DNA	63
b.	Electroforesis en gel de agarosa	64
6.	<i>Asignación de alelos</i>	66
7.	<i>Armado de haplotipos</i>	67
8.	<i>Análisis estadístico</i>	68
a.	Distancias genéticas	68
<b>VII.</b>	<b>Resultados</b>	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>Discusión</b>	<b>80</b>
<b>IX.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>88</b>
<b>X.</b>	<b>Apéndice</b>	<b>90</b>
1.	<i>Reactivos</i>	90
2.	<i>Material y equipo</i>	94
<b>XI.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>95</b>

## Índice de cuadros

Cuadro 1:	Genes en la región HLA	11
Cuadro 2:	Antígenos oficiales reconocidos serológica y celularmente	26
Cuadro 3:	Alelos HLA clase I y equivalencia serológica	27
Cuadro 4:	Iniciadores para los locus HLA-A y HLA-B	51
Cuadro 5:	Sondas para el locus HLA-A	57
Cuadro 6:	Sondas para el locus HLA-B	58
Cuadro 7:	Patrones de reacción de las sondas para el locus HLA-A	59
Cuadro 8:	Patrones de reacción de las sondas para el locus HLA-B	61
Cuadro 9:	Mezclas de iniciadores y temperaturas de alineación para PCR-ARMS/SSP	65
Cuadro 10:	Características generales de los Seris	70
Cuadro 11:	Tipificación de los loci A y B en Seris	74
Cuadro 12:	Haplotipos clase II – clase I presentes en la población Seri	78



# Índice de figuras

Figura 1: Mapa del MHC	12
Figura 2: Molécula HLA-A*0201 interaccionando con el TCR	14
Figura 3: Moléculas MHC	15
Figura 4: Estructura tridimensional de una molécula de clase I	16
Figura 5: Nicho de unión del péptido en una molécula clase II	16
Figura 6: Vía clásica de presentación de antígenos por clase I	20
Figura 7: Vía citosólica de presentación de antígenos exógenos	22
Figura 8: Vía no citosólica de presentación de antígenos exógenos	23
Figura 9: Nomenclatura de los alelos HLA	24
Figura 10: Alelos en cada locus definidos mediante técnicas serológicas y moleculares	29
Figura 11: Localización de los seris	38
Figura 12: PCR-SSP	41
Figura 13: PCR-ARMS	42
Figura 14: PCR-SSOP	43
Figura 15: Secuencia de prueba de las mezclas de iniciadores	67
Figura 16: Árboles genealógicos de los individuos incluidos en el estudio	71
Figura 17: Frecuencias de los alelos HLA-A en Seris	76
Figura 18: Frecuencias de los alelos HLA-B en Seris	77
Figura 19: Distancias genéticas entre distintas poblaciones	79
Figura 20: Frecuencia génica de B*27 en distintas poblaciones	83

# I. ABREVIATURAS

---

$\beta_2$ -m	$\beta_2$ -microglobulina.
ARMS	Sistema de amplificación de mutaciones refractarias.
ATP	Trifosfato de adenosina.
CPA	Células presentadoras de antígenos.
CSPD	Disodio 3-(4-metoxispiro {1,2-dioxetano-3,2'-(5' cloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decano}-il) fenil fosfato. C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> ClO <sub>7</sub> PN <sub>2</sub> .
ddUTP-DIG	Digoxigenin-11-2',3'-didesoxi-uridin-5'-trifosfato.
DIG	Digoxigenina.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
HLA	Antígenos de leucocitos humanos.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
RNA	Ácido ribonucleico.
SSOP	Sondas de oligonucleótidos secuencia específicos.
SSP	Iniciadores secuencia específicos.
TAP	Transportadores asociados con la presentación de antígenos.
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> .
TdT	Terminal transferasa. Nucleósido-trifosfato: DNA desoxinucleotidil exotransferasa, EC 2.7.7.31
Kb	Kilobase: mil residuos de nucleótidos
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .
Tc	Linfocitos T citotóxicos.

## II. RESUMEN

---

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) constituye el sistema más polimórfico que se ha descrito. Las moléculas HLA (Clase I y clase II) codificadas por los genes del MHC, actúan como elementos de restricción en la respuesta celular para el reconocimiento de antígenos propios y extraños y son indispensables para la inducción y regulación de la respuesta inmunológica, así como para la eliminación por citotoxicidad directa de células infectadas o células tumorales. El progreso explosivo de la biología molecular ha permitido el desarrollo de una gran variedad de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que hoy están muy bien estandarizadas y se usan rutinariamente para la tipificación de clase II en los laboratorios de inmunogenética molecular. Debido a que el polimorfismo de clase I es mucho mayor que el de clase II, su caracterización molecular ha sido más complicada. Existe una notable restricción del polimorfismo del MHC determinado por serología en las tribus indígenas americanas, sin embargo, los estudios realizados a nivel molecular han revelado la existencia de micropolimorfismos que son funcionalmente relevantes y que son exclusivos de estas poblaciones, probablemente debido a que confieren ventajas selectivas contra los patógenos de los nichos ecológicos de cada grupo. El propósito de este trabajo es el análisis del micropolimorfismo en una población indígena del norte de México, puesto que no existen datos de estos grupos. Gorodezky y col. han publicado datos de análisis molecular de genes clase II en lacandones, mixtecos y mazahuas, pero aún no se ha analizado clase I por DNA. Los seris se localizan en la costa del estado de Sonora y corresponden al grupo lingüístico Hokano-Coahuitleca. Son un grupo de solamente 619 indígenas que viven de acuerdo con sus tradiciones y preservan su identidad cultural. Además, no se mezclan con otras poblaciones, lo que sugiere que han preservado su identidad genética, dato que ha sido corroborado para genes clase II en este laboratorio.

Se obtuvieron muestras de 100 individuos pertenecientes a 9 familias que se tienen en el banco de DNA del Departamento. Se armaron los árboles genealógicos precisos que muestran las relaciones familiares entre ellos y se diseñó un cuestionario que contiene sus datos generales, clínicos y de hábitos alimentarios, de tabaquismo y alcoholismo. Las enfermedades prevalentes entre los seris son infecciones intestinales y respiratorias, hipertensión, desnutrición, patologías reumáticas y urinarias así como diabetes tipo II; la incidencia de tabaquismo es del 19% y el 21% de ellos ingiere alcohol. De las muestras de sangre periférica se separaron las células mononucleares y se extrajo el DNA mediante el protocolo de extracción por proteinasa K y fenol-cloroformo. Para la definición genética de los loci A y B se utilizaron 2 métodos de tipificación molecular: 1.-PCR usando primers de secuencia específica (PCR-SSP) combinado con un sistema de amplificación mediante mutaciones refractarias (PCR-ARMS); y 2.-PCR con tipificación por hibridación con sondas de oligonucleótidos sintéticos secuencia específicos (PCR-SSOP).

Se encontraron presentes siete alelos HLA-A, en frecuencias decrecientes son: \*0201, \*02, \*68, \*68/69, \*31, \*24 y \*2301; y doce alelos HLA-B: 3501, \*40, \*51, \*35, \*3505, \*5102, \*3512, \*27052, \*15, \*4801, \*3501/05 y 44. El caso del B\*27052 es muy particular ya que no se han identificado hasta ahora alelos B27 en ninguna otra tribu indígena de México. Al analizar las frecuencias en las familias considerando los cromosomas parentales y comparando con las frecuencias de los individuos menos relacionados, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Los principales haplotipos HLA DRB-A-B son: \*0407-\*0201-\*3501 (13.6%), \*0802-\*31-\*51 (9.1%), \*0407-\*02-\*3501 (6.8%), \*0802-\*02-\*35 (6.8%), \*0407-\*68-\*3501 (4.6%), \*0407-\*31-\*5102 (4.6%), \*0802-\*02-\*40 (4.6%), \*0802-\*0201-\*40 (4.6%), \*0802-\*24-\*3501 (4.6%), \*1402-\*02-\*40 (4.6%), \*1402-\*0201-\*40 (4.6%). En los haplotipos se encuentra que cuando se considera únicamente clase II sólo se encuentran 7 haplotipos y que al incluir los datos de clase I éste número se incrementa hasta 26. Estos resultados sugieren que la región de clase I se encuentra bajo una presión selectiva mayor que la región de clase II.

Por último, se calcularon las distancias genéticas en base a las frecuencias génicas de los alelos de clase I y clase II contra las poblaciones siguientes reportadas en la literatura: Toba, Wichi, Terena, Guaraní, Kaingang, Bari, Lacandonés, Inuit, Japoneses, Chinos, Indígenas del norte de Argentina, y mestizos de Venezuela y México. Se demostró que los seris se encuentran

separados de las demás poblaciones y su relación más cercana se encuentra con los Warao de Venezuela que habitan un ecosistema costero al igual que los seris.

### III. INTRODUCCIÓN

---

## 1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad

### a. Descubrimiento

El complejo principal de histocompatibilidad o MHC, una región del genoma con un polimorfismo muy extenso, debe su nombre a que originalmente se reconoció a las moléculas HLA, producto de los genes del MHC, como responsables del rechazo de transplantes entre individuos que no comparten los mismos determinantes MHC. No es sino hasta la década de los 50's en que se comenzó a revelar la importancia biológica y funcional del MHC (1). Los experimentos de trasplante de piel realizados por George Snell y sus colaboradores en cepas de ratones mostraron que existe una base genética en el rechazo de tejidos y que a pesar de que diferentes genes pueden contribuir a este fenómeno, una sola región genética es la principal responsable del rechazo (2). Los genes involucrados en el reconocimiento de un tejido como extraño fueron llamados genes de histocompatibilidad, la región en que se encuentran en el ratón se denominó H-2 y se localiza en el cromosoma 17. En todas las especies de vertebrados que se han examinado se han encontrado regiones polimórficas similares y a todas ellas se les denomina complejo principal de histocompatibilidad o MHC (1). El análisis genético del rechazo indicaba que los productos del MHC siguen la primera ley de Mendel y se expresan de manera codominante y los eventos de recombinación permitieron saber que la región del MHC contenía no solo uno sino varios genes relacionados muy cercanos entre sí (1).

El descubrimiento del MHC en el hombre se llevó a cabo cuando en la década de los 50's, Jean Dausset describió el primer antígeno de histocompatibilidad al cual llamó MAC (denominado oficialmente HLA-A\*02 de acuerdo con la nomenclatura molecular actual y cuya definición

serológica correspondiente es el antígeno HLA-A2) en base al patrón de reactividad de los anticuerpos presentes en el suero de pacientes politransfundidos; casi inmediatamente después, Payne y van Rood observaron lo mismo a partir de sueros provenientes de mujeres multíparas (2). Posteriormente, el trabajo de colaboración a través de los Talleres Internacionales que se organizan periódicamente permitió la identificación de los antígenos de leucocitos humanos (HLA) que son producto de los genes del MHC en el hombre, y han permitido la estandarización de los distintos métodos y los reactivos necesarios para la tipificación y el desarrollo de nuevas técnicas (3).

Los tres primeros loci de la región del MHC que fueron identificados en el hombre mediante los estudios serológicos fueron denominados HLA-A, HLA-B y HLA-C, y posteriormente en la región adyacente denominada HLA-D, originalmente definida mediante estudios de proliferación en cultivo mixto de linfocitos, se identificaron los loci HLA-DR (por "relacionado con D"), HLA-DQ y la región HLA-DP cuyos antígenos se identificaron mediante el uso del cultivo de mezcla de linfocitos secundario (1,2).

## **b. Organización genética del MHC**

El MHC en el hombre está constituido por un conjunto de genes codificados en el brazo corto del cromosoma 6 y los productos de su expresión, los antígenos HLA, actúan como elementos de restricción en la respuesta inmunológica, para el reconocimiento de antígenos propios y extraños. El MHC abarca 3800 Kb y se distinguen tres regiones principales denominadas: clase I, clase II y clase III. Dentro de estas regiones se localizan a su vez distintos loci o posiciones genéticas que contienen a cada grupo de genes (4). Dentro de las regiones de clase I y de clase II se localizan los loci que codifican para los antígenos de histocompatibilidad. En la región de clase I se ubican los loci HLA-A, B y C (clásicos) y E, F, G, H y X (no clásicos); y en la región de clase II se hallan los loci HLA-DR, DP, DQ, DM, DN, LMP y TAP. Además existen una gran cantidad de pseudogenes (5, 6). La región de clase III comprende a diversos genes no HLA (4).

En el Cuadro 1 se señalan los 37 genes HLA que se encuentran bien caracterizados, la mayoría de los cuales son funcionales, aunque hay algunos pseudogenes. Los genes tienen una

nomenclatura oficial de acuerdo al último taller internacional (27) que se señala en la primera columna y en la columna siguiente se encuentran los nombres que se les fue dando conforme fueron descritos como una nomenclatura provisional, la descripción indica si se trata de un pseudogen o si se ha encontrado cual es su función.

En la Figura 1 se esquematiza el mapa oficial de acuerdo a los últimos hallazgos del 12º Taller Internacional de Histocompatibilidad. La región de clase I abarca aproximadamente 1000 Kb, codifica para la expresión de los antígenos clásicos: 94 HLA-A, 208 HLA-B y 52 HLA-C. Los no clásicos no se expresan en células maduras y se hallan en la superficie de trofoblastos y la interfaz materno-fetal (5,7).

La región de clase II es más compleja: el locus DRB contiene a los genes DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DRB6, DRB7, DRB8 y DRB9 que codifican para las cadenas  $\beta$ 1,  $\beta$ 3, ... $\beta$ 9 y el DRA1 que codifica para la cadena  $\alpha$ . Al unirse estas cadenas dan lugar a las diferentes moléculas. Los antígenos DR1-10 son productos del gen DRB1, los DR52 están codificados por el gen DRB3, los DR53 por DRB4 y los DR5 por DRB5. En las regiones DQ y DP los genes que dan lugar a la expresión de las moléculas son DQA1 y DQB1, y DPA1 y DPB1 respectivamente. Además de que en esta región se codifican las moléculas TAP, LMP y DM que están relacionadas con el procesamiento de antígenos (8).

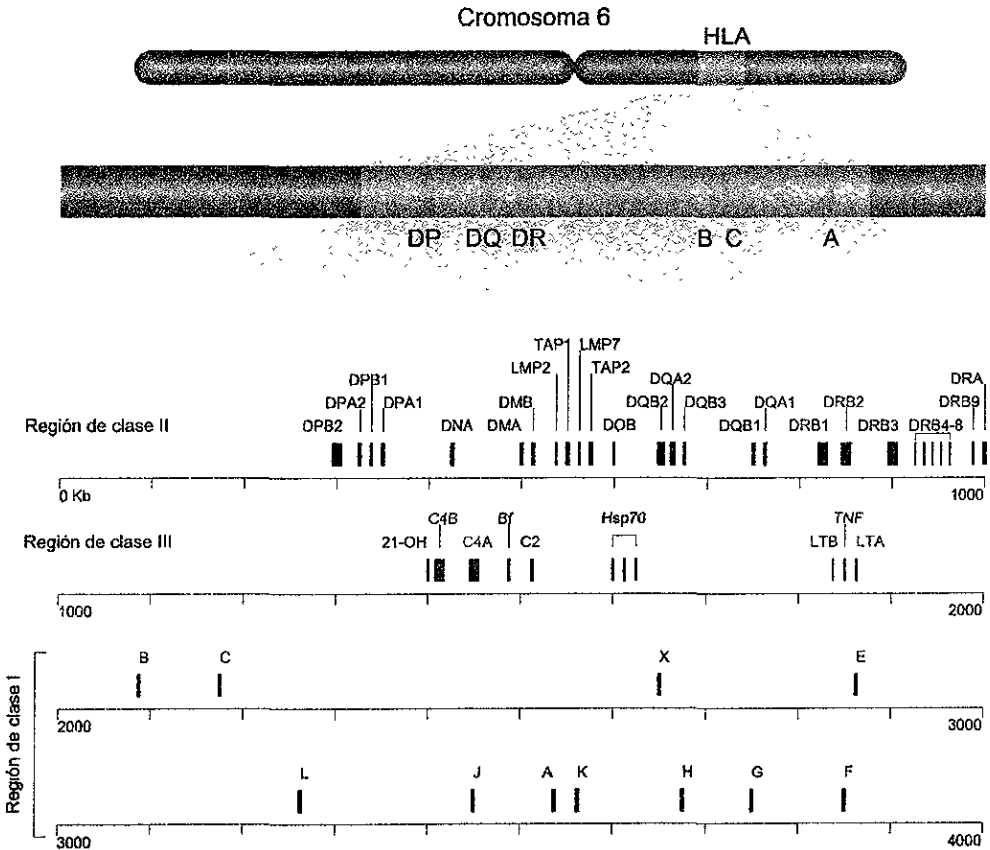


Cuadro 1: Genes en la región HLA

Nombre	Equivalentes previos	Descripción
HLA-A	-	Clase I, cadena $\alpha$
HLA-B	-	Clase I, cadena $\alpha$
HLA-C	-	Clase I, cadena $\alpha$
HLA-E	E, '6.2'	Clase I, no clásico
HLA-F	F, '5.4'	Clase I, no clásico
HLA-G	G, '6.0'	Clase I, no clásico
HLA-H	H, AR, '12.4'	Pseudogen clase I
HLA-J	cda12	Pseudogen clase I
HLA-K	HLA-70	Pseudogen clase I
HLA-L	HLA-92	Pseudogen clase I
HLA-DRA	DR $\alpha$	DR $\alpha$
HLA-DRB1	DR $\beta$ I, DR1B	DR $\beta$ 1
HLA-DRB2	DR $\beta$ II	Pseudogen DR $\beta$
HLA-DRB3	DR $\beta$ III, DR3B	DR $\beta$ 3
HLA-DRB4	DR $\beta$ IV, DR4B	DR $\beta$ 4
HLA-DRB5	DR $\beta$ III	DR $\beta$ 5
HLA-DRB6	DRBX, DRB $\sigma$	Pseudogen DRB
HLA-DRB7	DRB $\psi$ 1	Pseudogen DRB
HLA-DRB8	DRB $\psi$ 2	Pseudogen DRB
HLA-DRB9	M4.2 $\beta$ exón	Pseudogen DRB
HLA-DQA1	DQ $\alpha$ 1, DQ1A	DQ $\alpha$
HLA-DQB1	DQ $\beta$ 1, DQ1B	DQ $\beta$
HLA-DQA2	DX $\alpha$ , DQ2A	DQ $\alpha$ (no se ha encontrado expresada)
HLA-DQB2	DX $\beta$ , DO2B	DQ $\beta$ (no se ha encontrado expresada)
HLA-DQB3	DV $\beta$ , DQB3	DQ $\beta$ (no se ha encontrado expresada)
HLA-DOB	DO $\beta$	DO $\beta$
HLA-DMA	RING6	DM $\alpha$
HLA-DMB	RING7	DM $\beta$
HLA-DNA	DZ $\alpha$ , DO $\alpha$	DN $\alpha$
HLA-DPA1	DP $\alpha$ 1, DP1A	DP $\alpha$
HLA-DPB1	DP $\beta$ 1, DP1B	DP $\beta$
HLA-DPA2	DP $\alpha$ 2, DP2A	Pseudogen DP $\alpha$
HLA-DPB2	DP $\beta$ 2, DP2B	Pseudogen DP $\beta$
TAP1	RING4, Y3, PSF1	Transportador ABC (ATP Binding Cassette)
TAP2	RING11, Y1, PSF2	Transportador ABC (ATP Binding Cassette)
LMP2	RING12	Secuencia relacionada al proteasoma
LMP7	RING10	Secuencia relacionada al proteasoma

Tomado de JG Bodmer y col. 1997 (27)

Figura 1: Mapa del MHC



Tomado de J Trowsdale y RD Campbell, 1997 (9)

### c. Estructura y función

Los antígenos HLA se encuentran expresados en la superficie celular de todas las células nucleadas del organismo y su función es discernir lo propio de lo extraño, impidiendo el desarrollo de respuestas autoinmunes que pueden conducir a un estado patológico, por lo que son fundamentales en la generación de tolerancia muy temprano en la ontogenia. Por otro lado, tienen como función presentar antígenos propios y extraños a los linfocitos T responsables de la respuesta inmunológica, uniendo a los péptidos de estos antígenos una vez que han sido procesados en el interior de la célula (10). En la Figura 2 se muestra la interacción entre una molécula clase I (abajo) y el TCR. La imagen se generó utilizando el programa de visualización de moléculas RasMol (11).

Las regiones de clase I, clase II y clase III se distinguen por su estructura y función, aunque las clase I y II pertenecen a una misma superfamilia de genes, tienen una gran similitud estructural y funcional y se ha sugerido que descienden de un gen ancestral común (30).

Los genes clase I se expresan en prácticamente todas las células del organismo y están formados por una cadena pesada  $\alpha$  (45kDa) que es una glicoproteína asociada no covalentemente con la  $\beta_2$ -microglobulina (12kDa). Esta última se encuentra codificada en el cromosoma 15. La cadena pesada, codificada dentro del MHC, tiene una región intracitoplasmática, una transmembranal y tres dominios extramembranales llamados  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Los antígenos de clase II se expresan sobre las células presentadoras de antígeno (CPA), linfocitos B, células endoteliales, epiteliales y linfocitos T, y se encuentran formados por dos cadenas glicoprotéicas, una pesada  $\alpha$  de 35kDa y otra ligera  $\beta$  de 28kDa. Ambas tienen una región intracitoplásmica, una transmembranal y dos dominios extramembranales y están asociadas no covalentemente una con otra. El polimorfismo tan extraordinario tanto de las moléculas clase I como de clase II radica en los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en clase I y en el dominio  $\beta 1$  en clase II (aunque en  $DP\alpha$  y  $DQ\alpha$  existe alguna variabilidad) (12). Las cadenas  $\alpha$  en las moléculas clase I son glicoproteínas de aproximadamente 340 aminoácidos con 30 residuos en la región intracitoplásmica (13).

Figura 2: Molécula HLA-A\*0201 interaccionando con el TCR

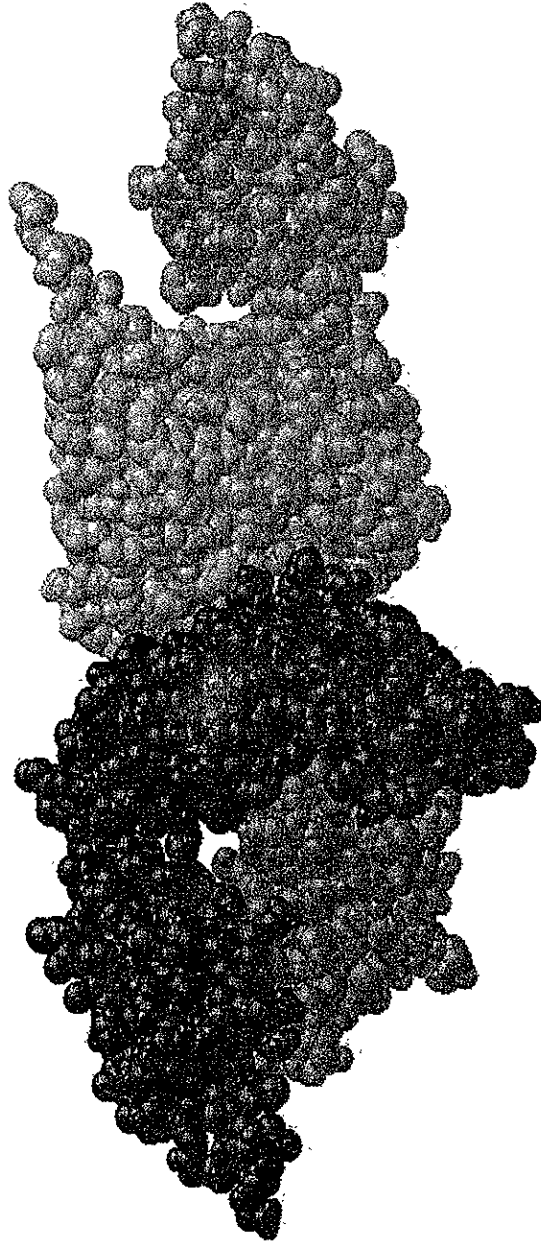
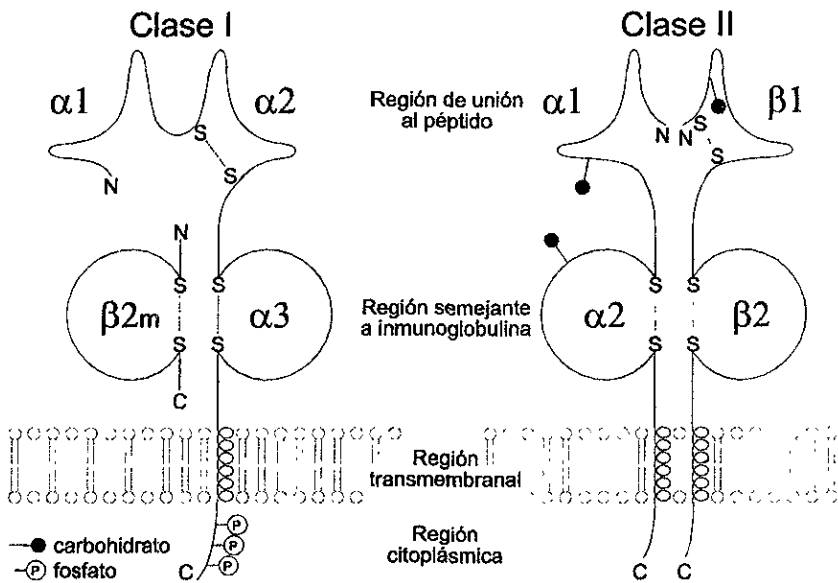
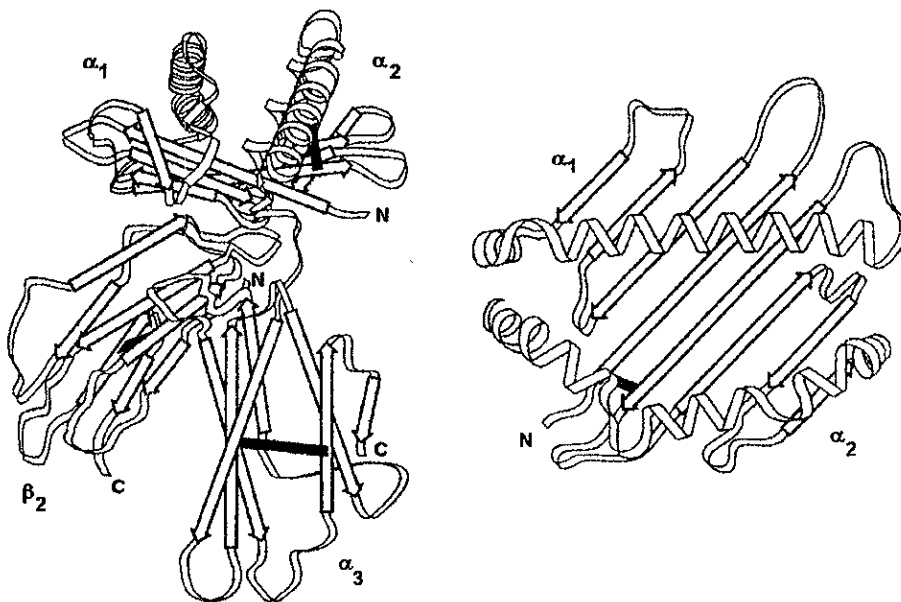


Figura 3: Moléculas MHC



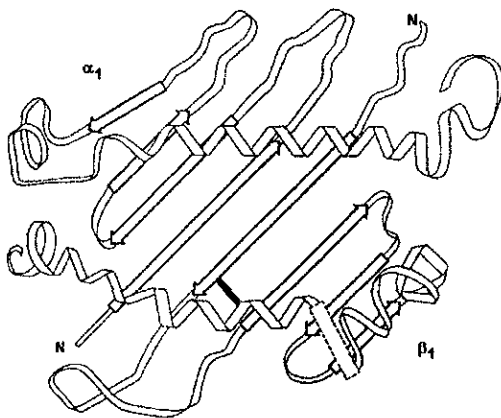
Tomado de AK Abbas, AH Lichtman y JS Pober, 1994 (1)

Figura 4: Estructura tridimensional de una molécula de clase I



Tomado de AK Abbas, AH Lichtman y JS Pober, 1994 (1)

Figura 5: Nicho de unión del péptido en una molécula clase II



Tomado de AK Abbas, AH Lichtman y JS Pober, 1994 (1)

En la Figura 3 se observan esquemáticamente las características estructurales de las moléculas clase I y clase II, las regiones citoplasmática, transmembranal y extracitoplásmica de estas moléculas, como están organizados sus dominios de manera que en clase I el nicho de unión al péptido está formado por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , y en clase II por  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ .

Los antígenos clase I presentan principalmente péptidos de origen endógeno, por lo que corre a cargo de estas moléculas la presentación de antígenos virales, tumorales y de parásitos intracelulares. Cuando los linfocitos T citotóxicos se encuentran con moléculas clase I que presentan péptidos extraños, se activan poniendo en marcha sus mecanismos de citotoxicidad y destruyendo las células tumorales o infectadas (10).

En la Figura 4 se muestra la estructura tridimensional de una molécula clase I obtenida mediante cristalografía de rayos X. Esta técnica hace uso de los patrones de difracción en un haz de rayos X que atraviesa la sustancia cristalizada; la difracción depende de los planos de la red cristalina y permite determinar la estructura de la molécula. Se aprecia claramente en la imagen obtenida por la cristalografía que los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  forman un nicho de unión donde un pino con una estructura  $\beta$  plegada está limitada por dos bordes configurados en forma de  $\alpha$  hélice.

Los antígenos clase II se ocupan en general de la presentación de los péptidos exógenos en las CPA, por lo que estas moléculas presentan los antígenos de las bacterias y parásitos extracelulares a los linfocitos B y T cooperadores para desencadenar una respuesta humoral así como para inducir y regular la respuesta celular en contra de los antígenos extraños (14, 15).

En la Figura 5 se aprecia como es notable la similitud entre el nicho de unión de clase II con el de clase I, teniendo ambos la misma estructura general solo que en este caso el nicho está conformado por los dominios más externos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ .

Las moléculas de clase III no codifican para antígenos de histocompatibilidad sino para factores involucrados en la activación de la respuesta inmunológica humoral y otros genes con distintas funciones que se encuentran situados entre las regiones de clase I y clase II (Figura 1) Ahí se encuentran entre otros los genes que codifican para moléculas de la vía clásica y de la vía alterna del complemento (C2, C4, Bf), los genes que codifican para la expresión del factor de

necrosis tumoral  $\alpha$  TNF- $\alpha$ , la proteína de choque térmico HSP-70 y el gen del citocromo P-450 que gobierna la expresión de la 21-hidroxilasa (16).

#### **d. Procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas HLA clase I**

Los mecanismos humorales de inmunidad resultan inefectivos en contra de tumores o virus intracelulares, situación que representa un problema especial puesto que los agentes etiológicos se encuentran ocultos en el interior de la célula. Este problema se soluciona en buena medida por medio de la presentación de antígenos en el contexto de las moléculas HLA clase I, las cuales presentan fragmentos de proteínas celulares. Normalmente se presentan solamente péptidos de origen autólogo que son ignorados por el sistema inmune, pero si la célula tiene incorporada o está sintetizando una proteína extraña (en células infectadas por virus, células tumorales o con expresión desregulada de sus propios genes) la presentación del péptido desconocido desencadenará una respuesta mediada por los  $T_c$  (linfocitos T citotóxicos) (10, 17).

Existen dos vías de presentación, la clásica que se ocupa de la presentación de péptidos de origen endógeno, y la no clásica que permite presentar péptidos exógenos.

#### **i. Presentación de péptidos endógenos**

Los péptidos presentados en el contexto de las moléculas clase I se originan en el citosol y provienen de proteínas que se hidrolizan hasta llegar a oligopéptidos en un proceso dependiente de ATP. Esta hidrólisis se lleva a cabo por la acción del proteasoma. Se reconocen dos formas del proteasoma, la 20S de 700kDa que tiene una estructura cilíndrica formada por cuatro anillos; los dos externos están formados por siete subunidades  $\alpha$  que se cree tienen una función reguladora y estructural, y los anillos internos que se encuentran formados por siete subunidades  $\beta$  que forman los sitios catalíticos. La segunda forma del proteasoma, la 26S de 1500kDa tiene la misma estructura de la 20S pero se asocia a subunidades que regulan su actividad. La estructura 26S se une a cadenas de poliubiquitina y es responsable de la degradación de proteínas conjugadas a ubiquitina, así pues la ubiquitina sirve como una marca para la degradación rápida de las proteínas.



El proteasoma es responsable de la degradación extralisosomal de la mayor parte de las proteínas y genera péptidos de 5 a 11 aminoácidos de longitud (10,18).

Dentro de las subunidades  $\beta$  del proteasoma se encuentran los productos de los genes LMP2 y LMP7 que están codificados dentro de la región de clase II del MHC. Estas moléculas provocan que el proteasoma hidrolice en sitios que favorecen la producción de péptidos inmunogénicos (10,19).

Los péptidos generados en el citoplasma pasan al retículo endoplásmico mediante las moléculas TAP (transportadores asociados con la presentación de antígenos). Las moléculas TAP son heterodímeros con subunidades de 76kDa (TAP1) y 70kDa (TAP2). El transporte de los péptidos al interior del retículo endoplásmico es un proceso dependiente de ATP en el que los péptidos transportados son seleccionados por su longitud más que por su secuencia. Los TAP solo transportan péptidos de más de 7 residuos y su eficiencia se reduce dramáticamente cuando el tamaño se encuentra por encima de 12 aminoácidos. Este es el rango óptimo de tamaño que permite la unión eficiente de péptidos de las moléculas clase I del MHC (1,20).

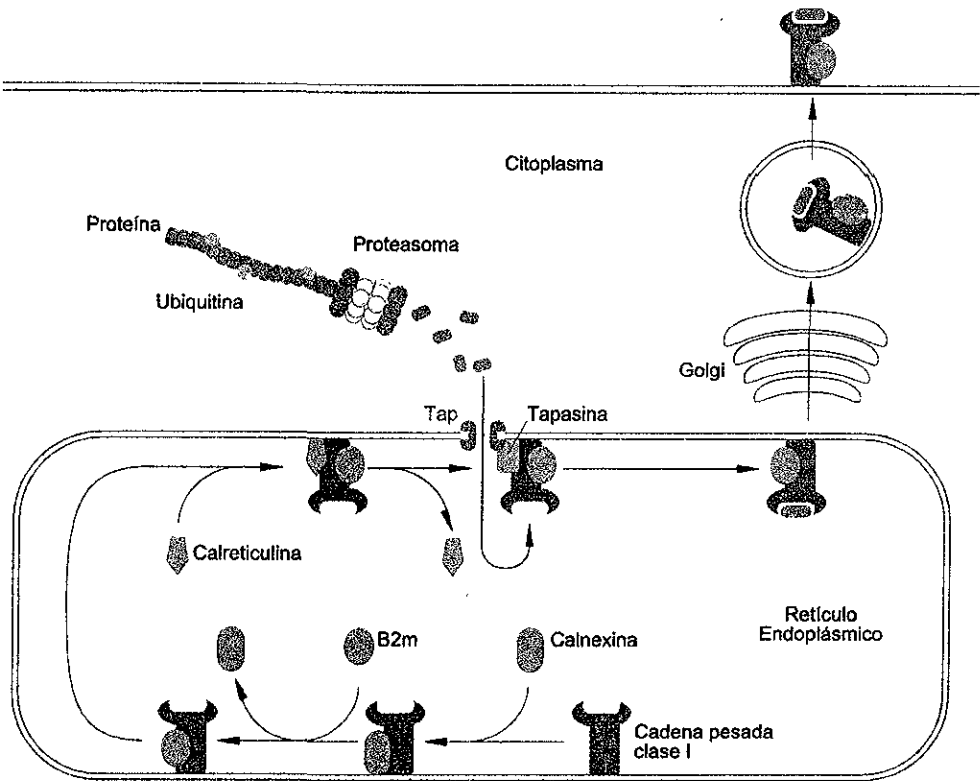
Para que el péptido pueda ser transportado eficientemente hasta la superficie de la célula es necesario que la cadena  $\alpha$  del HLA, la  $\beta_2$ -m y el péptido se ensamblen coordinadamente. Este proceso ocurre dentro del retículo endoplásmico. Primeramente se asocian la cadena pesada y la  $\beta_2$ -m y posteriormente el péptido se une dando estabilidad a la molécula clase I (10).

El proceso de ensamblaje de este complejo se ve facilitado por una serie de interacciones moleculares en las que la cadena pesada o el complejo formado por esta y la  $\beta_2$ -m se asocia con proteínas chaperonas del retículo endoplásmico. La cadena pesada recién sintetizada se une a la calnexina (una proteína), la calnexina es desplazada por la  $\beta_2$ -m y el heterodímero cadena pesada- $\beta_2$ -m se une a la calreticulina (otra molécula chaperona que une calcio). Este complejo se asocia a las proteínas TAP mediante la proteína tapasina. (21). En la Figura 6 se esquematiza la vía clásica de presentación y el proceso de ensamble de las moléculas clase I.

Después de que la molécula clase I se ensambla y une al péptido que va a presentar, pasa a través del aparato de Golgi donde se modifican los carbohidratos de la molécula y son llevados

hasta la membrana celular mediante la vía exocítica. La vida media de las moléculas MHC clase I varía considerablemente dependiendo del tipo de célula y el alelo específico del que se trate (oscila entre 2 y 20 horas). En aquellas células como los linfocitos T y los macrófagos en que el complejo puede ser endocitado, éste puede reciclarse o ser degradado.

Figura 6: Vía clásica de presentación de antígenos por clase I



Tomado de T Elliott y col. 1997 (21)

## ii. Presentación de péptidos exógenos por moléculas clase I

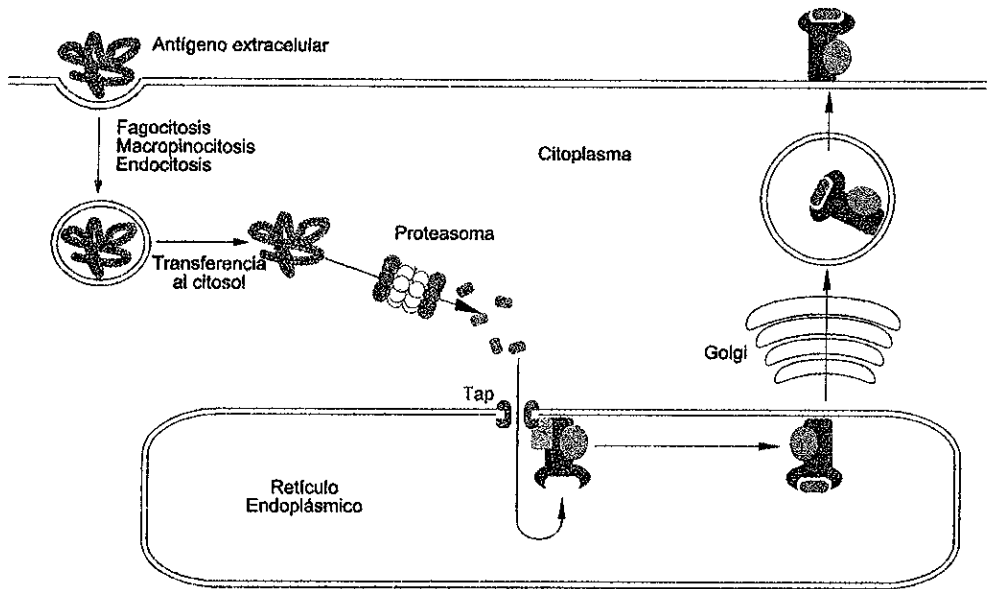
Además de la vía clásica de presentación de antígenos para clase I descrita en la sección anterior, en la que se presentan únicamente antígenos generados dentro de la propia célula, también se pueden presentar péptidos exógenos en determinadas circunstancias (22).

El proceso de presentación de antígenos exógenos por moléculas clase I puede jugar un papel importante en la vigilancia de patógenos intracelulares como *Mycobacterium*, *Plasmodium* y *Leishmania*, que son capaces de sobrevivir en los fagosomas, permitiendo la destrucción de las células infectadas (22,23). Esta vía alterna puede ser importante también en la respuesta contra procesos patológicos en tejidos somáticos mediante la importación de antígenos para su presentación sobre CPAs favoreciendo así el inicio de la respuesta inmunológica, ya que estas células pueden migrar a los órganos linfoides y poseen factores coestimuladores que son necesarios para la iniciación de la respuesta. Finalmente, este mecanismo puede abrir una vía para la producción de vacunas hechas con patógenos muertos que sean capaces de estimular la respuesta celular (24,25).

La capacidad de presentar péptidos exógenos puede originarse de la facultad de ciertos péptidos para pasar al citosol en donde son degradados por el proteasoma y siguen entonces la vía clásica de presentación como se esquematiza en la vía citosólica en la Figura 7.

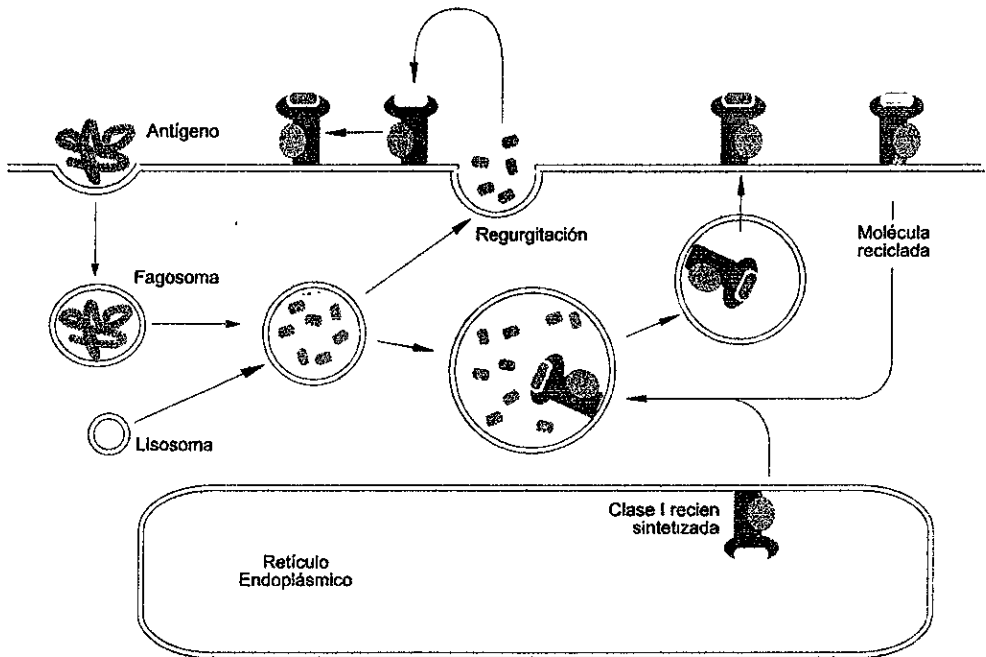
Otros péptidos pueden presentarse unidos a moléculas clase I sin necesidad de pasar por el citoplasma, en este caso las vesículas fagocíticas liberan su contenido al exterior de la célula donde los péptidos liberados pueden unirse a las moléculas clase I que puedan haber llegado vacías hasta la superficie (18) o complejos clase I reciclados o recién sintetizados pueden ser transportados hacia las vesículas fagocíticas como se esquematiza en la vía no citosólica en la Figura 8.

Figura 7: Vía citosólica de presentación de antígenos exógenos



Tomado de KL Rock y col. 1996 (24)

Figura 8: Vía no citosólica de presentación de antígenos exógenos

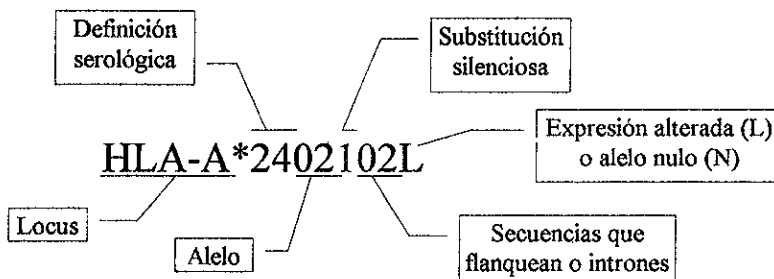


Tomado de KL Rock y col. 1996 (24)

## e. Nomenclatura

Para la identificación de los alelos se sigue un modelo numérico en el que primero se especifica el locus y a continuación, separado por un asterisco, el número del alelo. De este número los dos primeros dígitos representan la definición serológica del alelo (en los casos en que esto es posible). Los dos siguientes números identifican el alelo específico del que se trata. De ser necesario un quinto dígito identificaría una mutación silenciosa en el alelo, y un sexto y séptimo dígitos identificarían polimorfismo en los intrones o secuencias que flanquean al alelo. Opcionalmente, un alelo nulo puede expresarse con una "N" final y un alelo con niveles de expresión alterados se define con una "L" (26,27). En la Figura 9 se esquematiza un ejemplo de nomenclatura en el que se indica a que corresponde cada una de las partes del nombre del alelo.

Figura 9: Nomenclatura de los alelos HLA



El descubrimiento continuo de secuencias HLA y el desarrollo de las técnicas moleculares de tipificación ha hecho cada vez más difícil el mantener el vínculo con la definición serológica de los alelos, de manera que siempre que es posible se trata de asignar el grupo serológico pero el nombre debe verse tan solo como lo que es, una designación única (27).

La designación completa sólo es necesaria en el caso de que exista alguna ambigüedad. p ej.: en el caso de que no sea posible distinguir entre las variantes de la definición serológica del antígeno A2 con la designación A\*02 es suficiente (26).

## f. Polimorfismo del MHC

El MHC es el sistema más polimórfico que se ha descrito y constantemente se están descubriendo nuevos alelos. Hasta 1996 el comité de nomenclatura para factores del HLA de la OMS reconocía dentro de clase I: 83 variantes moleculares para el locus A, 186 para el locus B, 42 para el locus C, 5 para locus E y 7 para locus G (27).

En el Cuadro 2 se enlistan los antígenos demostrados hasta ahora por técnicas serológicas (Locus HLA-A, B y C de clase I y DR y DQ de clase II) o por métodos celulares (D y DP). Entre paréntesis se indica la especificidad pública; por ejemplo el A9 se subdivide en A23 y A24 que son las especificidades privadas o la proteína real que tiene el individuo, pues el A9 comparte secuencias tanto de A23 como de A24. A Bw4, Bw6, DR51, DR52 y DR53 se les denomina supertípicos y esto significa que son antígenos comunes a una gran cantidad de alelos que comparten estas secuencias.

En el Cuadro 3 se enlistan las variantes moleculares oficialmente descritas para las moléculas clase I, así como las correspondencias antigénicas respectivas. Como ejemplo véase el A2. Por medio de técnicas de DNA se identifican 22 variantes del A2: del A\*0201 al A\*0222. Sin embargo, serológicamente solo se pueden distinguir el A2 y dos subtipos que son el A203 y A210. Obviamente, para muchas aplicaciones, es indispensable la definición molecular, como en el terreno de la genética de poblaciones o en la búsqueda de genes de susceptibilidad a enfermedades o en la ubicación de donadores no relacionados para trasplante. En todas estas aplicaciones definir una persona solo como A2 ya no es suficiente.

Cuadro 2: Antígenos oficiales reconocidos serológicamente y celularmente

A	B	C	D	DR	DQ	DP	
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B5102	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B5103	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B52(5)	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B53	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B54(22)	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B55(22)	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B56(22)	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B18	B57(17)		Dw11(w7)	DR10		
A2403	B21	B58(17)		Dw12	DR11(5)		
A25(10)	B22	B59		Dw13	DR12(5)		
A26(10)	B27	B60(40)		Dw14	DR13(8)		
A28	B2706	B61(40)		Dw15	DR14(6)		
A29(19)	B35	B62(15)		Dw16	DR1403		
A30(19)	B37	B63(15)		Dw17(w7)	DR1404		
A31(19)	B38(16)	B64(14)		Dw18(w6)	DR15(2)		
A32(19)	B39(16)	B65(14)		Dw19(w6)	DR16(2)		
A33(19)	B3901	B67		Dw20	DR17(3)		
A34(10)	B3902	B70		Dw21	DR18(3)		
A36	B40	B71(70)		Dw22			
A43	B4005	B72(70)		Dw23	DR51		
A66(10)	B41	B73		Dw24			
A68(28)	B42	B75(15)		Dw25	DR52		
A69(26)	B44(12)	B76(15)		Dw26			
A74(19)	B45(12)	B77(15)			DR53		
A80	B46	B78					
	B47	B81					
	B48						
		Bw4					
		Bw6					



### Cuadro 3: Alelos HLA clase I y equivalencia serológica

Alelo	Serología	Alelo	Serología	Alelo	Serología
A*0101	A1	A*1102	A11	A*2902	A29(19)
A*0102	A1	A*1103	A11	A*2903	-
A*0201	A2	A*1104	A11	A*3001	A30(19)
A*0202	A2	A*2301	A23(9)	A*3002	A30(19)
A*0203	A203	A*2402101	A24(9)	A*3003	A30(19)
A*0204	A2	A*2402102L	-	A*3004	A30(19)
A*0205	A2	A*2403	A2403	A*31012	A31(19)
A*0206	A2	A*2404	A24(9)	A*3201	A32(19)
A*0207	A2	A*2405	A24(9)	A*3202	A32(19)
A*0208	A2	A*2406	A24(9)	A*3301	A33(19)
A*0209	A2	A*2407	A24(9)	A*3303	A33(19)
A*0210	A210	A*2408	A24(9)	A*3401	A34(10)
A*0211	A2	A*2409N	A 'Blanco'	A*3402	A34(10)
A*0212	A2	A*2410	A9	A*3601	A36
A*0213	A2	A*2411N	A 'Blanco'	A*4301	A43
A*0214	A2	A*2413	A24(9)	A*6601	A66(10)
A*0215N	A 'Blanco'	A*2414	A24(9)	A*6602	A66(10)
A*0216	A2	A*2501	A25(11)	A*6603	A10
A*0217	A2	A*2502	A10	A*68011	A68(28)
A*0218	A2	A*2601	A26(10)	A*68012	A68(28)
A*0219	-	A*2602	A26(10)	A*6802	A68(28)
A*0220	A2	A*2603	A26(10)	A*6803	A28
A*0221	A2	A*2604	A26(10)	A*6901	A69(28)
A*0222	A2	A*2605	A26(10)	A*7401	A74(19)
A*0301	A3	A*2606	A26(10)	A*7402	A74(19)
A*0302	A3	A*2607	A26(10)	A*7403	A19
A*0303N	A 'Blanco'	A*2608	A26(10)	A*8001	A80
A*1101	A11	A*2901	A29(19)		

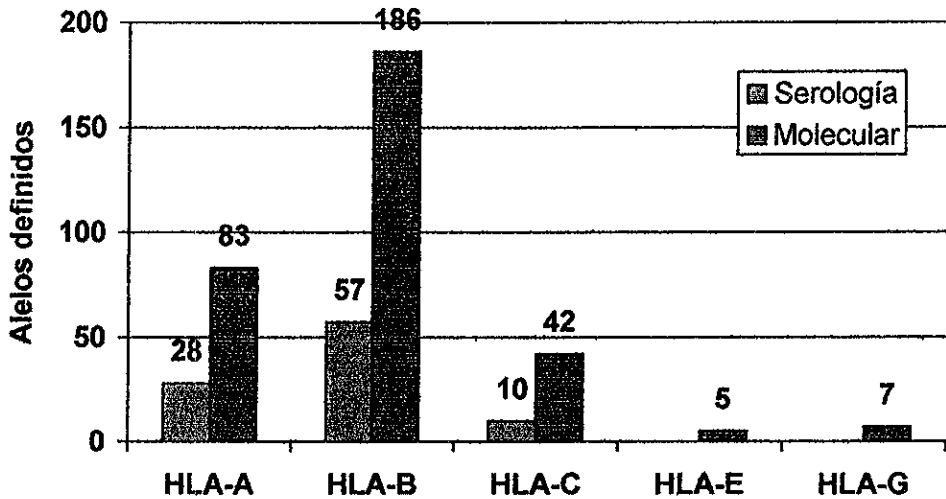
Alelo	Serología	Alelo	Serología	Alelo	Serología
Cw*0102	Cw1	Cw*0802	Cw8	E*0101	-
Cw*0103	Cw1	Cw*0803	Cw8	E*0102	-
Cw*02021	Cw2	Cw*12021	-	E*01031	-
Cw*02022	Cw2	Cw*12022	-	E*01032	-
Cw*02023	Cw2	Cw*1203	-	E*0104	-
Cw*0302	Cw10(w3)	Cw*1204	-		
Cw*0303	Cw9(w3)	Cw*1301	-	G*01011	-
Cw*0304	Cw10(w3)	Cw*1402	-	G*01012	-
Cw*0401	Cw4	Cw*1403	-	G*01013	-
Cw*0402	Cw4	Cw*1502	-	G*0102	-
Cw*0403	-	Cw*1503	-	G*0103	-
Cw*0501	Cw5	Cw*1504	-	G*0104	-
Cw*0602	Cw6	Cw*15051	-	G*0105N	-
Cw*0701	Cw7	Cw*15052	-		
Cw*0702	Cw7	Cw*1601	-		
Cw*0703	Cw7	Cw*1602	-		
Cw*0704	Cw7	Cw*1604	-		
Cw*0705	-	Cw*1701	-		
Cw*0706	Cw7	Cw*1702	-		
Cw*0707	-	Cw*1801	-		
Cw*0801	Cw8	Cw*1802	-		

Cuadro 3 (Continuación)

Alelo	Serología	Alelo	Serología	Alelo	Serología
B*0702	B7	B*2704	B27	B*4102	B41
B*0703	B703	B*27052	B27	B*4201	B42
B*0704	B7	B*27053	B27	B*4202	B42
B*0705	B7	B*2706	B27	B*4402	B44(12)
B*0706	B7	B*2707	B27	B*44031	B44(12)
B*0707	B7	B*2708	B2708	B*44032	B44(12)
B*0708	-	B*2709	B27	B*4404	B44(12)
B*0801	B8	B*2710	B27	B*4405	B44(12)
B*0802	B8	B*2711	B27	B*4406	B44(12)
B*0803	B8	B*3501	B35	B*4407	B44(12)
B*0804	-	B*3502	B35	B*4408	B44(12)
B*1301	B13	B*3503	B35	B*4409	B12
B*1302	B13	B*3504	B35	B*4410	-
B*1303	-	B*3505	B35	B*4501	B45(12)
B*1304	-	B*3506	B35	B*4601	B46
B*1401	B64(14)	B*3507	B35	B*4701	B47
B*1402	B65(14)	B*3508	B35	B*4702	B47
B*1501	B62(15)	B*35091	B35	B*4801	B48
B*1502	B75(15)	B*35092	B35	B*4802	B48
B*1503	B72(70)	B*3510	-	B*4803	-
B*1504	B62(15)	B*3511	B35	B*4901	B49(21)
B*1505	B62(15)	B*3512	B35	B*5001	B50(21)
B*1506	B62(15)	B*3513	B35	B*5002	-
B*1507	B62(15)	B*3514	B35	B*51011	B51(5)
B*1508	B62(15)	B*3515	B35	B*51012	B51(5)
B*1509	B70	B*3516	-	B*51021	B5102
B*1510	B71(70)	B*3517	B35	B*51022	B5102
B*1511	B15	B*3518	B35	B*5103	B5103
B*1512	B76(15)	B*3519	B35	B*5104	B51(5)
B*1513	B77(15)	B*3520	B35	B*5105	B51(5)
B*1514	B76(15)	B*3521	-	B*5106	B5
B*1515	B62(15)	B*3701	B37	B*5107	B51(5)
B*1516	B63(15)	B*3702	-	B*5108	B51(5)
B*1517	B63(15)	B*3901	B39(16)	B*5109	B51(5)
B*1518	B71(70)	B*3902	B39(16)	B*52011	B52(5)
B*1519	B76(15)	B*39011	B3901	B*52012	B52(5)
B*1520	B62(15)	B*39013	B3901	B*5301	B53
B*1521	B75(15)	B*39021	B3902	B*5302	-
B*1522	-	B*39022	B3902	B*5401	B54(22)
B*1523	-	B*3903	B39(16)	B*5501	B55(22)
B*1524	B62(15)	B*3904	B39(16)	B*5502	B55(22)
B*1525	B62(15)	B*3905	B16	B*5503	-
B*1526N	B 'Blanco'	B*39061	B39(16)	B*5504	B55(22)
B*1527	B62(15)	B*39062	B39(16)	B*5505	B22
B*1528	B15	B*3907	-	B*5601	B56(22)
B*1529	B15	B*3908	B39(16)	B*5602	B56(22)
B*1530	B75(15)	B*3909	B39(16)	B*5603	B22
B*1531	B75(15)	B*3910	B39(16)	B*5701	B57(17)
B*1532	B62(15)	B*3911	-	B*5702	B57(17)
B*1533	B15	B*3912	B39(16)	B*5703	B57(17)
B*1534	B15	B*40011	B60(40)	B*5704	B57(17)
B*1535	B15	B*40012	B60(40)	B*5801	B58(17)
B*1536	-	B*4002	B61(40)	B*5802	-
B*1537	-	B*4003	B40	B*5901	B59
B*1801	B18	B*4004	B40	B*67011	B67
B*1802	B18	B*4005	B4005	B*67012	B67
B*1803	B18	B*4006	B61(40)	B*7301	B73
B*1804	-	B*4007	-	B*7801	B78
B*1805	B18	B*4008	-	B*78021	B78
B*2701	B27	B*4009	B61(40)	B*78022	B78
B*2702	B27	B*4010	B60(40)	B*8101	B81, B56b
B*2703	B27	B*4101	B41	B*8201	-

Tomado de Bodmer, Marsh, Albert y col. 1997 (27)

Figura 10: Alelos en cada locus definidos mediante técnicas serológicas y moleculares



En la Figura 10 se resalta claramente la diversidad dentro de los loci de clase I y aunque el polimorfismo es ya de por sí muy grande a nivel de las proteínas, la variabilidad molecular pareciera no tener límite, pues continuamente se describen alelos nuevos incluyendo los descritos en mexicanos por nuestro grupo (28, 29). Así pues es evidente que la diversidad molecular es de 3 a 4 veces mayor de lo que se observa a nivel bioquímico, como se desprende de la Figura 10.

El MHC es una poderosa herramienta genética, tanto a nivel individual como poblacional por su gran polimorfismo. El estudio de frecuencias de alelos y haplotipos en distintas poblaciones nos permite identificar a cada grupo étnico, establecer relaciones genéticas entre ellos y rastrear los orígenes de las poblaciones actuales (30,31). Estas investigaciones han sido de gran valor para el estudio de grupos aborígenes y que viven muchos de ellos en condiciones de aislamiento. Las tribus amerindias han sido los grupos humanos mejor estudiados y han permitido proponer rutas de migración intercontinentales a partir de Asia (32,33), al igual que otros aspectos entre los que ahora se están enfatizando los funcionales y de impacto epidemiológico de los genes

## **g. Significado biológico y evolución del polimorfismo en clase I**

Aunque en la región de clase I se hallan más genes codificados que los clásicos HLA-A, B y C, solamente estos presentan un polimorfismo importante. La diversidad genética puede ser una consecuencia de la selección natural sobre la función de presentación de antígenos (5) o bien puede ser producto del azar u otros mecanismos que se describen más adelante.

La región de clase I en conjunto muestra señales de estar sujeta a un rápido proceso de evolución a través de mecanismos de duplicación genética y delección, lo que se hace evidente por la gran cantidad de pseudogenes y fragmentos que son subproducto de estos eventos (5).

La recombinación en sus diferentes formas juega un papel muy importante en la generación del polimorfismo. Entre los mecanismos de recombinación están la duplicación genética, mediante la cual se generan nuevos loci en la recombinación no homóloga. La recombinación cromosómica en la meiosis provoca la creación de nuevos haplotipos y la conversión alélica genera nuevos alelos a un ritmo mucho mayor del que permitiría la sola mutación puntual. Los mecanismos de recombinación por sí solos no son capaces de generar diversidad, se requiere primeramente la acumulación de un cierto número de mutaciones puntuales para que sobre esta variabilidad actúen los mecanismos de recombinación generando alelos nuevos a una velocidad mucho mayor. La velocidad a la que se generan mutaciones puntuales en el MHC no es distinta de la de otros sistemas genéticos, pero no pueden aplicarse sobre éste, métodos convencionales para calcular tiempos de divergencia, ya que los procesos de recombinación aceleran grandemente los procesos de generación de nuevos alelos (30).

Biológicamente, el polimorfismo probablemente confiere una ventaja selectiva a las especies al permitir presentar una mayor diversidad de antígenos, ya que algunos alelos pueden unir péptidos que otros no, por su complementariedad estructural. Los alelos presentes en una población posiblemente sean seleccionados de acuerdo con las presiones ambientales a que se vea sometida dicha población en cada nicho ecológico particular (5). Esto se ve apoyado por el hecho de que las mutaciones que distinguen un alelo de otro no se dan al azar, sino que la mayor parte de ellas originan sustituciones de aminoácidos principalmente en el nicho de unión del péptido o en la

región que entra en contacto con el receptor de la célula T, sitios que son funcionalmente cruciales (34, 35).

Los mecanismos evolutivos son diversos e incluyen los que se describe a continuación:

- **Mutaciones puntuales:** Estas implican cambios en la secuencia de bases en el DNA de los genes que codifican para sus respectivos antígenos. Dichos cambios pueden resultar en sustituciones a nivel de los aminoácidos que conformarán las cadenas peptídicas. Se pueden encontrar ejemplos de alelos que difieren en un nucleótido únicamente, y esto puede dar lugar o no a la sustitución de un aminoácido, por ejemplo, entre los alelos B\*35091 y B\*35092 existe una variación a nivel de la secuencia de nucleótidos pero esto no repercute en el aminoácido codificado (27), mientras que entre los alelos A\*0207 y A\*0215N hay una sola diferencia en la secuencia de aminoácidos al parecer producida por una mutación puntual, sin embargo el cambio provoca que haya un codón de terminación prematuro que causa que la molécula no se exprese (34).
- **Duplicación / deleción génica:** Estos eventos son el resultado de un entrecruzamiento no homólogo entre los cromosomas, lo cual puede originar que un gen se repita dos veces en el cromosoma, que sea interrumpida su secuencia o que el gen sea eliminado completamente. Por lo que hasta ahora sabemos los loci A, B y C se formaron por eventos de duplicación génica, cuyos productos luego se diferenciaron uno de otro mediante otros mecanismos, esta divergencia debió haber tenido lugar antes de la diferenciación entre el hombre, el chimpancé y el gorila entre 4 y 8 millones de años atrás, ya que entre estas especies existen homologías reconocibles, pero no por ejemplo entre el hombre y el ratón que difieren entre si en alrededor de 80 millones de años de evolución (5,30) Se piensa además que los pseudogenes como HLA-H, J, K y L, y fragmentos génicos dentro de la región de clase I son el resultado de eventos de duplicación o de deleción de genes que antes fueron funcionales (5,27).
- **Conversión génica:** Es una forma de recombinación en la que un pequeño fragmento de un gen se incorpora en la secuencia de otro en forma de una doble recombinación entre alelos del mismo locus (conversión interalélica) o más raramente entre alelos de distintos

genes (conversión intergénica). Por ejemplo es posible que el alelo A\*0203 se haya generado a partir de la conversión del A\*0201 con un alelo de la familia A10, lo cual originó sustituciones en los codones 149, 152 y 156 (5,30).

El origen último de una variante polimórfica es la mutación puntual con nuevas combinaciones de las mutaciones mediante mecanismos de recombinación y conversión génica. Se cree que la mayor parte de las mutaciones que pueden dar origen a distintas variantes de un gen se encontrarán en desventaja selectiva y por lo tanto estas variantes se mantienen en la población en una frecuencia baja como resultado del equilibrio entre la generación de nuevas mutaciones y la selección en contra de estas. Este mecanismo solo podría explicar la distribución de los alelos HLA más raros (36).

Las mutaciones que ocasionalmente ofrecen una ventaja selectiva incrementan su frecuencia de manera relativamente rápida en la población, dando la base para la adaptación evolutiva. Las mutaciones neutrales pueden incrementar su frecuencia por azar. Este incremento se ve afectado importantemente por el tamaño de la población, de manera que es importante en grupos pequeños y lo es menos en una población grande, a este fenómeno se le denomina deriva génica (36).

Aunque el efecto de la deriva génica en las poblaciones humanas es apreciable, es muy poco probable que sea este el mecanismo por el que se han generado las variantes funcionales que se observan. Si esta fuese la explicación del polimorfismo, sólo estaría influida por la frecuencia de las mutaciones, tamaño de la población y patrones de migración, lo cual conduciría a niveles comparables de variabilidad para todas las regiones en el DNA. Si hay diferencias en la diversidad, significa que probablemente está actuando un proceso de selección natural que discrimina los efectos funcionales de las distintas variantes, tal es el caso en la región HLA (36).

Existe homología de secuencias inclusive interespecie, de tal manera que un aloantisuero de una especie puede reconocer diferencias polimórficas en otra distinta. Por ejemplo entre antígenos bovinos y humanos (37). Existen secuencias cortas o epitopes que pueden ser reconocidas por anticuerpos monoclonales y el patrón de reacciones serológicas que presentan indica que un alelo se encuentra definido por una combinación particular de secuencias, las cuales se hallan conservadas. El resultado es que diferentes alelos se formarían por la recombinación de epitopes.

La persistencia de secuencias comunes entre especies al parecer refleja la existencia de epitopes y combinaciones entre estos que deben haberse mantenido debido a que pueden ser relevantes en cuanto a su funcionalidad (36).

## **2. Estructura genética de las poblaciones amerindias**

El continente americano fue colonizado recientemente en comparación con otros continentes (hace 10 000~40 000 años), por pequeños grupos humanos que migraron desde Asia a través del estrecho de Bering. Con la posterior migración de estas poblaciones hacia el sur del continente, se establecieron grupos que evolucionaron en un aislamiento relativo hasta la llegada de los europeos. Las evidencias genéticas, lingüísticas y arqueológicas son consistentes con un escenario como este, lo que ha repercutido en la generación de características muy especiales en la distribución de los alelos HLA en cada grupo humano (30).

La posibilidad de determinar con un grado relativo de exactitud la fecha de la colonización, la identificación de posibles ancestros en Asia y Oceanía y el estado de aislamiento en el que se han mantenido muchas de las tribus amerindias, hacen que el análisis de estas poblaciones sea particularmente valioso para estudios antropológicos, de polimorfismo genético y de evaluación de los efectos de fuerzas selectivas. En este sentido, las poblaciones amerindias han brindado pistas muy importantes sobre la evolución y el polimorfismo HLA, y sobre los orígenes de las poblaciones humanas (45,38).

Durante la conquista de América por los españoles las culturas preexistentes fueron destruidas y millones de personas murieron. Como ejemplo, en el territorio mexicano la población indígena cayó de 25 millones en 1519 a 1 millón en 1605. El principal azote a que se debieron estas muertes fueron devastadoras epidemias traídas por los europeos. El grado en que estas epidemias arrasaron con los pobladores nativos se ha atribuido a la limitada variabilidad genética que se encuentra en las poblaciones amerindias. Inclusive se ha postulado que el limitado número de variantes HLA resulta en una desventaja inmunológica cuando se compara contra las poblaciones urbanas (39). Sin embargo hay que considerar que también se han presentado epidemias catastróficas contra poblaciones consideradas más heterogéneas como en el caso de la peste en Europa entre 1347 y 1351, y el número de alelos que se han encontrado en las

poblaciones amerindias es comparable al que se ha descrito en poblaciones nativas de otros continentes. El grado de variabilidad en ellos bien puede reflejar el nivel de polimorfismo natural, que puede ser el resultado de una selección darwiniana dirigida por patógenos (30, 40). Se ha sugerido que la susceptibilidad tan elevada de estas poblaciones a las enfermedades traídas desde Europa, pudo haber sido el resultado de las condiciones de vida y factores como la desnutrición y deshidratación durante la enfermedad, servicios de salud inapropiados y desconocimiento de las nuevas enfermedades por parte de los curanderos, en el contexto de la completa desintegración social de la conquista estos factores debieron ser nefastos. Además de esto, se ha propuesto que las epidemias en el nuevo mundo pueden haber sido causadas por una forma maligna de las enfermedades contra las cuales carecían de la protección conferida por las formas benignas, a diferencia de los europeos (40).

A pesar del limitado polimorfismo encontrado en estas poblaciones, muchos nuevos alelos en particular del locus HLA-B, se han encontrado en estas poblaciones que no se hayan en ninguna otra del mundo. Se ha sugerido que esto se debe a un mecanismo de evolución rápida en este locus (45). Los alelos que se han encontrado en las poblaciones amerindias son idénticos o han evolucionado recientemente a partir de 4 alelos HLA-A (A\*0201, A\*2402, A\*31012 y A\*68012), 8 alelos HLA-B (B\*1501, B\*27052, B\*3501, B\*39011, B\*4002, B\*4801, B\*51011 y B\*52012) y 7 alelos HLA-C (Cw\*0102, Cw\*02022, Cw\*0304, Cw\*0401, Cw\*0702, Cw\*0801 y Cw\*1502), compartidos con las poblaciones europeas y asiáticas. Probablemente estos alelos representan aquellos que originalmente estuvieron presentes en las poblaciones fundadoras (41, 45).

Existen diferencias notables entre los alelos presentes en las poblaciones de Norte y Sudamérica, para las poblaciones indígenas de Norteamérica prácticamente todos sus alelos son los mismos que los de las poblaciones fundadoras orientales, mientras que en las poblaciones de Sudamérica existe una gran proporción de alelos nuevos derivados de los originales por mutación puntual y conversión alélica, por ejemplo los alelos B\*1504, B\*3506, B\*35092, B\*3511, B\*3512, B\*3517 B\*3518, B\*3519, B\*3903, B3905, B\*4004, B\*4009, B\*4803, B\*5104, A\*0212, A\*0219 y DRB1\*0417 son alelos nuevos que pueden haberse generado por eventos de conversión génica, el alelo B\*1520 por recombinación entre B\*1501 y B\*3501, y el Cw\*1503 por mutación



puntual del Cw\*1502 (41,42,43,45); en algunos casos estos nuevos alelos llegan a ser los prevalentes en las poblaciones en las que se han identificado. Se han observado pocos alelos nuevos en las poblaciones del norte mientras que en el sur se han observado mayor número de variantes. Se han encontrado tan solo 4 alelos de locus A y 14 de locus B en las poblaciones de Norteamérica, y en cambio el único alelo nuevo encontrado el B\*4005 (44). En los indios de Sudamérica se encuentran en locus A todos los alelos de las poblaciones del norte más unos cuantos subtipos nuevos, y en el locus B se han observado 7 de los catorce alelos del norte más 26 nuevos alelos (45). Resulta muy notable que en un periodo de tiempo similar, el perfil genético en las poblaciones de América del Norte haya permanecido relativamente constante mientras que en Sudamérica haya variado de manera significativa, esto puede explicarse por la existencia de presiones selectivas ocasionadas por patógenos sobre los alelos HLA (30,40).

Las evidencias son claras con respecto a que el continente americano fue colonizado del norte hacia el sur y durante las migraciones hacia el sur las poblaciones iban encontrando nuevos medios ambientales y patógenos. Bajo estas condiciones pudo haberse requerido presentar un repertorio más amplio de péptidos, por lo que en consecuencia es posible que se seleccionaran positivamente nuevos alelos, en función de respuestas específicas contra los parásitos endémicos en cada nicho ecológico particular (30,40).

Debido a que el polimorfismo en clase I no ha sido estudiado extensivamente en poblaciones de Asia y Oceanía, es necesario realizar mayor número de estudios para determinar cuales alelos son los que realmente han aparecido en América. Se ha propuesto que los alelos en Sudamérica que no se encuentran en el norte pueden haberse generado por una hipotética migración desde Oceanía hasta Sudamérica, sin embargo la hipótesis con mayor aceptación es que los nuevos alelos en Sudamérica se hayan originado *de novo* mediante eventos de recombinación. En contra de la hipótesis de la migración trans-pacífica se encuentra el hecho de que todos los nuevos alelos encontrados pertenecen a las mismas líneas alélicas ancestrales y en locus distintos del B no se presenta este gran incremento en el polimorfismo (45).

Las posibles explicaciones para la existencia de un mayor polimorfismo en el locus B pueden ser que desde un principio, en la población colonizadora original existía un mayor número de líneas alélicas para este locus, lo que pudo haber generado un mayor número de alelos por eventos

de recombinación. También es posible que este polimorfismo se desarrolló como una forma de adaptación a factores ambientales, de manera que esto pudo mantener y expandir el repertorio de péptidos que pueden ser presentados por los individuos en una población favoreciendo la heterocigocidad, parece que el locus B evoluciona de manera más rápida que los loci A y C, esto puede indicar diferencias funcionales entre estos loci o puede ocasionar que las variantes nuevas en otros loci tiendan a perderse por deriva génica (40).

Por este motivo se seleccionó para el análisis de clase I a una población indígena mexicana, los seris, la cual se describe a continuación.

### **a. Los Seris**

Los seris son una tribu indígena que habita en la costa desértica del estado de Sonora. Se llaman a sí mismos Konkaak o Kunkaak, “la gente”. La denominación ‘Seri’ proviene del yaqui y significa “Hombres de la arena”. Pertenecen al grupo lingüístico Hokano-Coahuilteca contrastando notablemente con otros grupos de la región que pertenecen al tronco etnolingüístico Uto-Azteca (Pimas, Pápagos, Yaquis y Mayos). Su relación más estrecha es con el yumano de la parte norte de la península de Baja California. Los troncos lingüísticos son muy importantes para la identificación de grupos genéticos, ya que la clasificación de las tribus se basa en las características lingüísticas y no en genéticas o de otra naturaleza.

Son tradicionalmente de costumbres nómadas y de acuerdo con los ciclos de pesca radican en diversos campos pesqueros a lo largo de su territorio de aproximadamente 100 Km de litoral, aunque hay dos localidades principales: Desemboque y Punta chueca. Su extensión geográfica abarca 211 000 ha. y conjunta la parte continental y la Isla de Tiburón. Por las características desérticas de su suelo, los seris mantienen como base de su economía la pesca y la elaboración de artesanías. Los poblados Seris carecen de calles pavimentadas, drenaje, luz eléctrica y agua potable. (46)

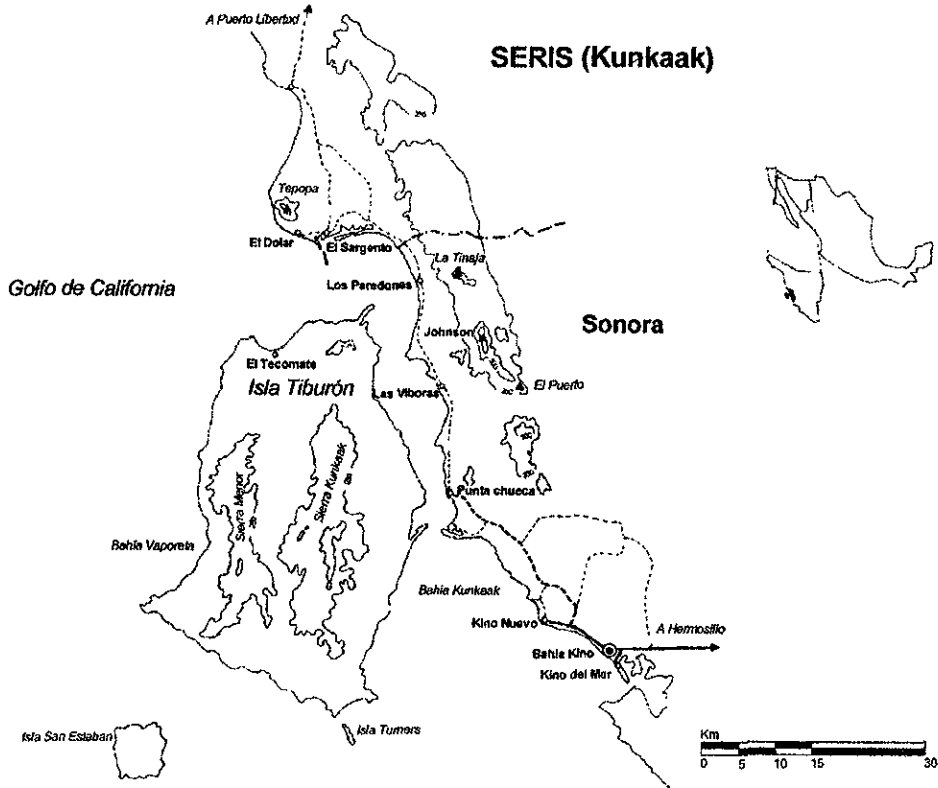
Antes de la llegada de los españoles el territorio seri estaba limitado por el mar, las cadenas montañosas, el río Yaqui y el desierto Altar, además de abarcar las islas cercanas: Tiburón, San Esteban, Patos y Alcatraz. A la llegada de los españoles no fueron conquistados gracias a que su

territorio no era fácilmente aprovechable, no tenían riquezas acumuladas ni eran útiles como mano de obra (no conocían la agricultura). Además, los intentos de agruparlos en poblados estables y evangelizarlos fracasaron. Más adelante en el periodo colonial e independiente fueron objeto de persecución y casi fueron aniquilados, de modo que los sobrevivientes se refugiaron en la isla Tiburón. Hacia 1930 los seris volvieron a establecerse en tierras continentales con la pesca como base de su economía, hasta que en la década de los 70's se reconoce su territorio y se les concede una zona de pesca exclusiva. En la Figura 11 se muestra un mapa de la ubicación geográfica de los seris.

Actualmente existen poco más de 600 individuos seris y se han caracterizado por resistirse a perder su identidad, su territorio y su autonomía. Mantienen su lengua con gran vitalidad y continúan incorporando nuevos términos para los elementos culturales que han tenido que admitir en lugar de limitarse a adoptar las palabras del español. La mayor parte de la población es en la actualidad bilingüe (español) e incluso trilingüe (inglés). Sus costumbres son endogámicas y evitan mezclarse con otros pueblos. Los principales contactos que sostienen con población no indígena son de carácter comercial y de servicios en Bahía Kino y Hermosillo. Además tienen un contacto intenso con extranjeros estadounidenses en el ámbito comercial y religioso. Las instituciones gubernamentales han propiciado la formación de consejos de índole política que permitan la interacción con otros indígenas de Sonora. Nunca han sido evangelizados formalmente y su cultura carece de los elementos católicos que existen en otros grupos. Existen solamente dos templos protestantes y la mayor parte se declaran practicantes de esta religión aunque sus ritos continúan estrechamente relacionados con la naturaleza (46). Los principales problemas de salud que los aquejan son enfermedades respiratorias y gastrointestinales, hipertensión, desnutrición, enfermedades reumáticas, urinarias y diabetes tipo II (47).

El trabajo artesanal constituye junto con la pesca las principales actividades económicas del grupo. La elaboración de artesanías consiste en la talla de madera de palo fierro, el tejido de coritas (canastos esféricos a veces de gran tamaño) y la elaboración de collares. La pesca comercial es redituable solamente de septiembre a mayo, el resto del año se realiza pesca de autoconsumo que se complementa con caza y recolección.

Figura 11: Localización de los seris



Tomado de Terrazas, Pérez, 1993 (46)

Su organización social incluye sistemas de ayuda recíproca para asegurar la supervivencia total del grupo como el “kimusi” que da derecho a todo miembro del grupo a procurarse parte de la comida que se consuma en cualquier parte de la comunidad sin requerir una invitación previa, el “kanoaa ana koit” que da derecho a pedir pescado a cualquier barca que regresa del mar o el “amaj” en el que todos los miembros de la tribu cooperan para la organización de sus celebraciones.

Los konkaak se han caracterizado por su resistencia a perder su identidad, su territorio y su autonomía valiéndose de su fortaleza lingüística, los mecanismos de cohesión y solidaridad internos, las restricciones para que haya matrimonios con “yoris” (extranjeros) y la renuencia a hablar de su vida ritual y mitológica que sigue profundamente ligada al mar y a los ciclos de la naturaleza (46).

### 3. Análisis basados en la reacción de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha constituido desde su invención por Kary Mullis, en una herramienta fundamental en el campo de la biología molecular. Sus aplicaciones dentro de este terreno continúan en rápida expansión gracias a su simplicidad y versatilidad (48). La PCR brinda la capacidad de amplificar segmentos específicos de DNA utilizando dos “primers” o iniciadores de oligonucleótidos que hibridan flanqueando la región que se va a amplificar cada uno en el extremo 5’ de una de las cadenas de la doble hebra de DNA.

La reacción se lleva a cabo mediante ciclos de temperaturas, comenzando con la separación de la doble cadena del DNA a 90-95°C (desnaturalización). Posteriormente se disminuye la temperatura hasta una en la que los iniciadores puedan unirse a sus secuencias complementarias a 40-65°C (alineación). Por último se calienta una vez más la reacción hasta 70-75°C (extensión), que es la temperatura óptima para la acción de la *Taq* polimerasa; los iniciadores permiten que la enzima *Taq* polimerasa una a los nucleótidos trifosfatados presentes en el medio de manera que se forma una cadena complementaria a la del DNA que sirve de molde. Este ciclo se repite una y otra vez, lo cual produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia debido a que los productos de un ciclo sirven de molde en el siguiente, duplicándose aproximadamente el número de copias en cada ciclo (49).

Actualmente existen una gran variedad de métodos de tipificación basados en la reacción de PCR. La llegada de la PCR resultó fundamental para el desarrollo de otras técnicas más exactas.

Los métodos que implican PCR pueden subdividirse en 3:

1. Los que generan un producto que contiene los polimorfismos y que pueden identificarse mediante una segunda técnica como por ejemplo: PCR-SSOP (tipificación con oligonucleótidos sintéticos de secuencia específica), Dot-Blot reverso.
2. Aquellos en los que el polimorfismo es identificado directamente durante el proceso de amplificación como los métodos de: PCR-SSP (tipificación con iniciadores de secuencia específica) y PCR-ARMS (tipificación mediante un sistema de amplificación de mutaciones refractarias).
3. Análisis conformacional en el que diferentes mutaciones ocasionan cambios conformacionales específicos en los productos de la PCR que se identifican por un análisis electroforético: análisis de heteroduplex, polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), electroforesis en un gel de gradiente desnaturizante (DGGE), o por electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE) (50).

De estas técnicas, a continuación se describen las que se usaron en este trabajo.

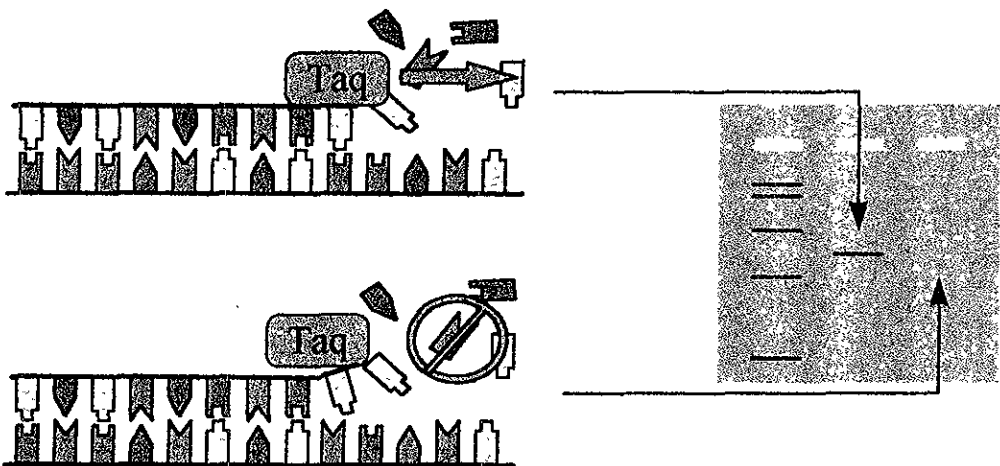
#### **a. Tipificación mediante iniciadores secuencia específicos (PCR-SSP)**

El gran número de copias que se generan en la reacción de la PCR permite que pueda visualizarse el producto de la amplificación simplemente mediante una electroforesis. Debido a que la acción de la *Taq* polimerasa requiere de la unión del iniciador, si esta no se lleva a cabo (por no haber complementariedad) o se lleva a cabo de manera deficiente (se une pero no hay una complementariedad total y parte del oligonucleótido queda sin unir) la amplificación no se lleva a cabo. En este sentido hay que hacer notar que puesto que la polimerasa actúa en sentido 5'→3' se requiere de una complementariedad perfecta en el extremo 3' del iniciador mientras que el extremo 5' puede tener algunas disparidades y aún así llevarse a cabo la amplificación. En esto se basa la tipificación mediante iniciadores secuencia específicos (PCR-SSP). Para esto se seleccionan iniciadores que permitan identificar modificaciones de una sola base en la secuencia del DNA haciendo que el último nucleótido del extremo 3' de uno de los iniciadores coincida justamente con el nucleótido que se está probando. La amplificación se llevará a cabo dependiendo de si coincide o no con la secuencia molde y se podrá saber cual es el nucleótido que se encuentra

en ese punto del DNA. La identificación de los nucleótidos que diferencian un alelo de otro por este método, permite saber cual es el alelo particular que existe de determinado gen y frecuentemente se necesitan varias reacciones de este tipo para identificar polimorfismos en distintos sitios (51,52).

En la Figura 12 se muestra esquemáticamente como se lleva a cabo la tipificación. Si el iniciador es complementario a la secuencia del DNA como se observa en la figura superior la Taq se une e incorpora nucleótidos, pero si el iniciador no es complementario en su extremo 3', como se muestra en la parte inferior de la figura, no habrá incorporación de nucleótidos. Las reacciones de amplificación positiva y negativa pueden identificarse en un gel por la aparición de una banda del tamaño específico del producto amplificado.

Figura 12: PCR-SSP



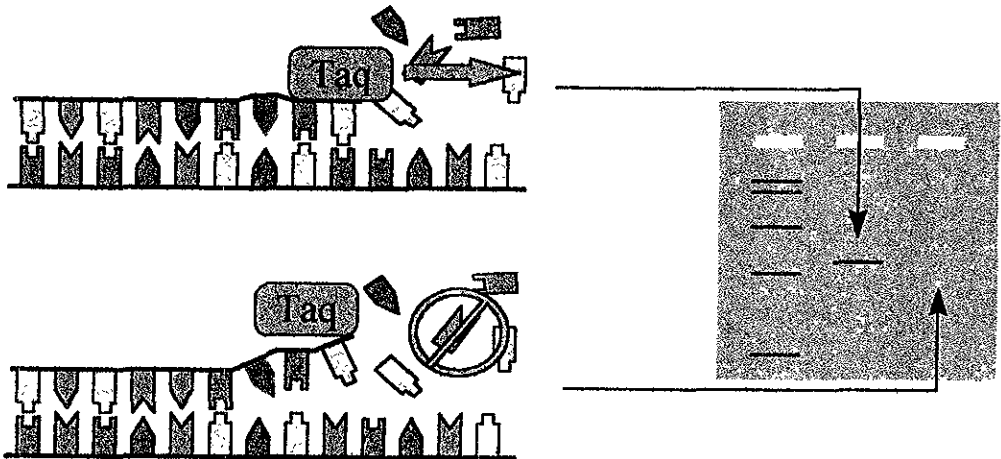
### b. Tipificación mediante mutaciones refractarias (PCR-ARMS)

Una variante de esta técnica es el método de amplificación mediante mutaciones refractarias (ARMS) en el que para asegurar que si no existe complementariedad en el último nucleótido (contando en sentido 5'→3') no haya amplificación, se introduce una disparidad en el iniciador en

una posición cercana al extremo 3', de manera que si el último nucleótido es complementario haya amplificación pero en el caso de que no sean complementarios, las dos disparidades (la introducida a propósito y la de la especificidad buscada) impidan totalmente la unión del extremo 3' del iniciador, y el resultado es que no hay amplificación (53,54).

En la Figura 13 se muestra esquemáticamente el principio de la PCR-ARMS: es muy similar a la PCR-SSP pero como se puede observar hay una base desapareada que ocasiona que si el extremo 3' no es complementario se separe una gran porción del iniciador impidiendo que la reacción se lleve a cabo.

Figura 13: PCR-ARMS



### c. Tipificación con sondas de oligonucleótidos (PCR-SSOP)

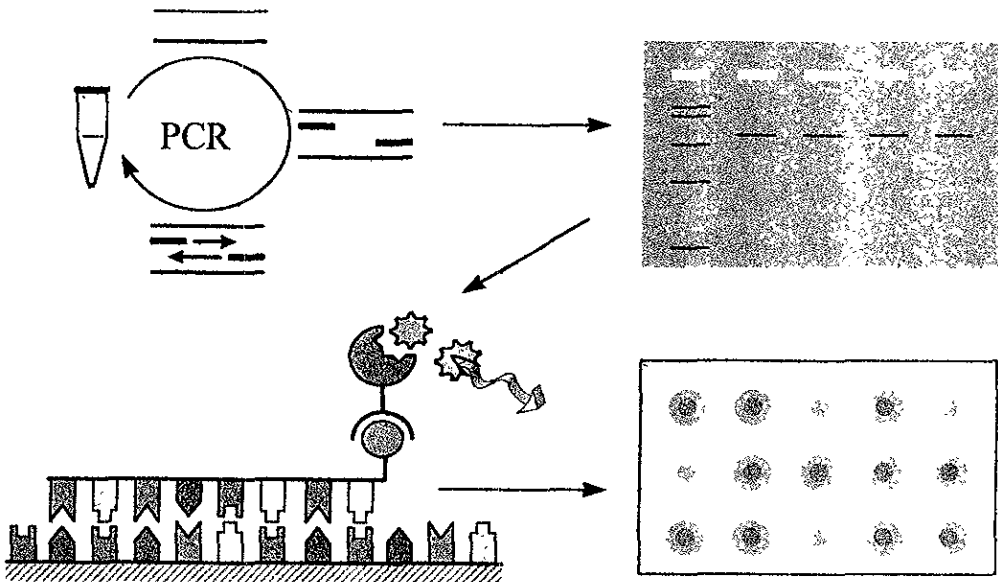
Una técnica de tipificación con un principio distinto es en la que se utilizan la PCR en conjunto con sondas de oligonucleótidos secuencia específicos (PCR-SSOP). En este caso, para la reacción de PCR se utilizan iniciadores que amplifican una región determinada del gen a estudiar, pero a diferencia de las técnicas anteriores se eligen de manera que amplifiquen todos los alelos que pueda haber del gen. El producto de la amplificación se fija en membranas de nylon en un formato de membrana conocido como Dot-Blot y posteriormente sobre estas



membranas se hacen hibridar las sondas de oligonucleótidos, de manera que si el DNA que se encuentra en la membrana y la sonda poseen secuencias complementarias, la sonda se unirá al DNA. Para verificar la hibridación las sondas se marcan ya sea radiactivamente o con una molécula que pueda ser reconocida con un anticuerpo conjugado a una enzima, para así poner en evidencia donde ha habido complementariedad. De esta manera, al hibridar con una gran variedad de sondas se determina el alelo del que se trata. En esta técnica la especificidad esta dada por las sondas, no por los iniciadores (55).

En la Figura 14 se muestra la PCR-SSOP: La amplificación resulta en un producto que se detecta en un gel y se fija posteriormente a una membrana. Las sondas tienen una marca contra la cual está dirigido un conjugado de enzima-anticuerpo y la detección puede hacerse gracias a la acción de la enzima sobre un sustrato que en este caso provoca la emisión de luz, la cual se detecta sobre una placa de película fotográfica.

Figura 14: PCR-SSOP



La tipificación molecular del MHC ha sido un gran avance y una necesidad fundamental, ya que aunque los antígenos HLA se descubrieron primero serológicamente y estas técnicas continúan aplicándose, no permiten una discriminación precisa entre los alelos como lo hacen las técnicas moleculares. Además de que la definición serológica esta sujeta a variables tales como la calidad y disponibilidad de los antisueros apropiados (56). En estudios de correlación entre los resultados de serología y tipificación molecular se ha encontrado que las técnicas moleculares de PCR-SSP y PCR-SSOP presentan una correlación muy alta en los resultados obtenidos, mientras que hay un porcentaje apreciable de discordancia entre los métodos moleculares y los serológicos que en ciertos casos no permiten discernir correctamente los alelos presentes (57).

## IV. OBJETIVOS

---

### a. Objetivo general

Desarrollar y estandarizar las técnicas de tipificación molecular para los genes clase I de los loci HLA-A y B del MHC y aplicarlas a la definición de la estructura genética de una población indígena.

### b. Objetivos particulares

1. Estandarizar la tipificación molecular de clase I mediante el uso de la PCR y la hibridación con sondas de oligonucleótidos sintéticos secuencia específicas (PCR-SSOP); y haciendo uso de iniciadores secuencia específicos (SSP) y un sistema de amplificación mediante mutaciones refractarias (ARMS).
2. Analizar la correlación entre los resultados de ambos métodos para verificar su concordancia.
3. Definir mediante estas técnicas la estructura molecular de los genes clase I de la población Seri del estado de Sonora.
4. Comparar el perfil genético de la población seri con la de otras poblaciones para determinar relaciones filogenéticas entre estas y la población seri.

## V. HIPÓTESIS

---

La tipificación molecular de genes clase I del MHC debe dar resultados congruentes entre los distintos métodos así como presentar ventajas respecto a la tipificación serológica en cuanto al nivel de resolución de alelos que sea posible alcanzar.

Ya que los seris constituyen una población predominantemente endogámica y asilada, su perfil genético debe encontrarse relativamente lejos del de otras poblaciones, particularmente de la población mestiza predominante en nuestro país. Su relación con otras poblaciones indígenas debe estar en relación con el grado de parentesco etnológico que guarden entre si.

Las características genéticas de los seris deben ser el resultado de las presiones inmunológicas que su ambiente ha ejercido sobre ellos, por lo que los datos que se obtengan pueden darnos algunas pistas sobre la manera como se desarrolla la selección por patógenos, con el MHC como unidad de selección.

## VI. MÉTODOS

---

### 1. Población estudiada

Se estudiaron 100 individuos seris pertenecientes a 25 familias de los poblados de Desemboque, Punta Chueca e Isla Tiburón. Los árboles genealógicos de cada una de las familias con los individuos incorporados se muestran en la sección de resultados del mismo modo que las características generales de la población.

### 2. Toma de muestras

Tres miembros del personal del Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hermosillo extrajeron 20 mL de sangre periférica con EDTA de cada uno de los individuos y se mezclaron volumen a volumen con medio RPMI-1640 suplementado con suero AB y antibióticos. Las muestras se enviaron al Departamento de Inmunogenética en la Ciudad de México, donde se procesaron para extraer y purificar el DNA. Todos los participantes en el estudio se sometieron a un interrogatorio preparado previamente que abarcó datos generales, lingüísticos, culturales e historias clínicas del que se desprenden los datos resumidos en la Cuadro 10

### 3. Obtención de DNA a partir de sangre periférica (58)

#### i. Congelación

1. Preparar la mezcla de congelación. Por cada mL de suspensión celular se prepara 1 mL de mezcla que contiene:

0.6 mL Medio RPMI 1640 (con antibióticos)

0.2 mL STF o suero AB

0.2 mL Dimetilsulfóxido

La mezcla deberá permanecer a 4°C para disminuir su toxicidad.

2. Colocar hielo picado en un recipiente y enfriar dos o más criotubos.
3. Agregar 1 mL de la mezcla de congelación a cada criotubo, y mantener en baño de hielo.
4. Ajustar las células obtenidas por separación con Ficoll-Hypaque o las subpoblaciones ya purificadas de linfocitos T y B, a una concentración de  $5 \times 10^6$  cel/mL con medio RPMI.
5. Adicionar lentamente 1 mL de suspensión celular lentamente sobre la mezcla de congelación, estratificando cuidadosamente para formar una interfase.
6. Mezclar los viales así preparados invirtiendo lentamente. Se tapar bien.
7. De inmediato se introducir al etanol frío (4°C) cuidando de que el alcohol no penetre en el vial y dejar durante 2 horas a -70°C.
8. Después pasar al tanque de nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento.

## ii. Descongelación

El DNA se extrajo a partir de las células mononucleares siguiendo este procedimiento.

1. Preparar un baño maría a 36-37°C.
2. Sacar inmediatamente el vial del tanque de nitrógeno líquido.
3. Sumergir en el baño maría y agitar.
4. Cuando casi desaparecen totalmente los cristales de hielo, vaciar el contenido lentamente y con agitación manual a un tubo de ensayo que se mantiene a 4°C y que contiene medio RPMI con 10% de STF o de suero AB.
5. Mezclar suavemente
6. Centrifugar a 1,500 rpm por 5 minutos.
7. Decantar el sobrenadante.
8. Añadir amortiguador de lisis de glóbulos blancos (WCLB) hasta 15 mL.
9. Incubar a 42°C toda la noche en baño maría.

## iii. Lisis y obtención de núcleos (58)

La lisis tiene por objeto eliminar las células rompiendo primeramente la membrana citoplásmica de los glóbulos rojos y después la de los glóbulos blancos para quedar finalmente tan solo con los núcleos de estos.

1. Vaciar 20 mL de sangre a un tubo marcado de 50 mL.
2. Centrifugar a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C y separar el plasma.
3. Con una pipeta Pasteur desechable transferir cuidadosamente la capa de células blancas "buffy coat" a otro tubo (no importa pasar también algunos eritrocitos).
4. Agregar solución de lisis I hasta llenar el tubo, agitar suavemente.
5. Centrifugar a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C. Desechar cuidadosamente el sobrenadante.
6. Repetir los pasos 3 a 5 hasta que queden las células blancas libres de eritrocitos (generalmente con 2 lisis es suficiente).
7. Al paquete de células blancas se les agrega solución de lisis II, se agita para desprender el paquete. Se completa el volumen del tubo con la solución de lisis II.
8. Centrifugar a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C. Desechar cuidadosamente el sobrenadante. En el fondo del tubo se encuentra el paquete de núcleos.

#### **iv. Obtención de DNA por digestión con Proteinasa K (58)**

En este paso se rompen las membranas nucleares con lo que el DNA se libera. La acción de la proteinasa K rompe las histonas y evita que el DNA sea atacado por nucleasas.

1. Resuspender el botón de leucocitos o de núcleos en 1 mL de SSC 1X.
2. Añadir 4 mL del amortiguador de lisis para glóbulos blancos (WCLB).
3. Dejar incubando toda la noche a 53°C en baño maría.

#### **v. Extracción con fenol/cloroformo (58)**

Esta extracción tiene como finalidad obtener el DNA libre de impurezas y los restos de las proteínas y proteinasa K del paso anterior.

1. Añadir un volumen equivalente (v/v) de una solución con fenol saturado.
2. Agitar 10 minutos manualmente de manera suave hasta obtener una emulsión completa.
3. Centrifugar 15 min a 3,000 rpm (1,600 xg) a 4°C.

4. De ser posible, colocar los tubos en hielo al terminar.
5. Tomar la fase superior y pasarla a un tubo limpio (Cuidado de no tomar la interfase).
6. Hacer una segunda extracción con fenol saturado de la misma manera.
7. Pasar la fase superior a un tubo limpio.
8. Extraer dos veces con fenol/cloroformo (v/v) centrifugando durante 15 min a 3,000 rpm a 4°C.
9. Pasar la fase superior a un tubo limpio.
10. Hacer una última extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (v/v).
11. Centrifugar 15 min a 3,000 rpm a 4°C.
12. Pasar la fase superior a un tubo nuevo.

#### **vi. Precipitación con isopropanol absoluto (58)**

Como paso final de la purificación se precipita el DNA de la siguiente forma.

1. Añadir NaCl 5M para obtener una concentración final de 100 mM.
2. Adicionar un volumen de isopropanol absoluto.
3. Agitar suavemente hasta que el DNA forme un precipitado blanco. La precipitación terminará cuando este flote.
4. El DNA flotante se puede recoger con una varilla de vidrio que tenga la punta curva o la punta de una micropipeta.
5. Lavar 10 veces en etanol al 70% frío sumergiendo y sacando la varilla con el DNA.
6. Se deja secar el DNA en la varilla colocándola invertida (con el DNA hacia arriba).
7. Cuando ya no hay exceso de etanol, resuspender el DNA en 1 mL de TE dejando la punta de la varilla con el DNA dentro del TE del tubo y retirándola cuidadosamente cuando el DNA empieza a hidratarse y resbala de la varilla.
8. Para que el DNA se resuspenda completamente, puede dejarse 2 ó 3 días a 4°C o varias horas en agitación continua a 65°C.
9. Para obtener la concentración del DNA se lee a 260 nm. Multiplicar la lectura por 50 y expresar en µg/mL. Puede leerse todo el DNA o hacer una dilución (1:100 ó 1:50).



## 4. Tipificación de los loci HLA-A y HLA B mediante PCR-SSOP (59)

Se utilizó el método diseñado por Middleton y col. para el trabajo del 12° Taller Internacional de Histocompatibilidad realizado en Francia en junio de 1997. Este método se utilizó para la tipificación de clase I de los loci A y B de acuerdo con el siguiente protocolo:

### a. Amplificación del DNA por PCR

Cuadro 4: Iniciadores para los locus HLA-A y HLA-B

Iniciador	Secuencia	Tamaño del producto
HLA-A		857 pb
AI	5' - gag ggt cgg gcg/a ggt ctc agc ca -3'	
ALAW	5' - tgg ccc ctg gta ccc gt -3'	
HLA-B		593
B1	5' - gac gac acc cag ttc gtg a -3'	
B2	5' - gac gac acg ctg ttc gtg a -3'	
D1	5' - gcc gcg gtc cag gag ct -3'	
D2	5' - gcg gcg gtc cag gag cg -3'	
D3	5' - gcg gcg gtc cag gag ct -3'	
D4	5' - gcc gcg gtc cag gag cg -3'	

### i. Preparación de la mezcla de amplificación

Por cada DNA a tipificar preparar la siguiente mezcla de amplificación:

Locus A:

dNTPs	10 µL
Amortiguador 10X	10 µL

MgCl <sub>2</sub>	6 μL
iniciador AI	1 μL
iniciador ALAW	1 μL
Taq polimerasa	0.4 μL
H <sub>2</sub> O	68.6 μL
DNA	3 μL

**Locus B:**

dNTPs	10 μL
Amortiguador 10X	10 μL
MgCl <sub>2</sub>	4 μL
iniciador B1	1 μL
iniciador B2	1 μL
Iniciador D1	1 μL
Iniciador D2	1 μL
Iniciador D3	1 μL
Iniciador D4	1 μL
Taq polimerasa	0.4 μL
H <sub>2</sub> O	66.6 μL
DNA	3 μL

Las cantidades de esta mezcla están calculadas para la amplificación de una sola muestra.

Los cálculos deberán hacerse de acuerdo al número de muestras a amplificar.

1. Descongelar los componentes de la mezcla en un baño a 37°C excepto la enzima que se debe dejar en el congelador hasta el momento de usarse.
2. Agregar en un tubo los dNTPs, el amortiguador, el MgCl<sub>2</sub> y los iniciadores. Mezclar y centrifugar.
3. En los tubos en los que se llevará a cabo la amplificación distribuir el agua y los DNAs.
4. Distribuir la mezcla en los tubos con el DNA, agregar dos gotas de aceite mineral y centrifugar durante 10 seg antes de introducir en el termociclador.

## ii. Amplificación de las muestras

Se empleó un termociclador MJ Research PTC-200 con los siguientes programas de amplificación:

Locus A:

96°C 3 min  
96°C 1 min ←  
60°C 45 seg ←  
72°C 1 min ←  
72°C 5 min

35 ciclos

Locus B:

96°C 3 min  
96°C 1 min ←  
56°C 45 seg ←  
72°C 1 min ←  
72°C 5 min

30 ciclos

## iii. Verificación de la amplificación

1. Una vez terminada la amplificación se prepara un gel de agarosa al 2% en TAE 1X y bromuro de etidio (10 µg/µL) 2.5 µL por cada 50 mL de solución.
2. Correr 10 µL de la reacción de amplificación con 5 µL del amortiguador de corrimiento LB 5X.
3. Para verificar el tamaño de las bandas obtenidas incluir como marcador de peso molecular 3 µL de fago φX174 digerido con HaeIII, 7 µL de agua y 5 µL de LB 5X.
4. Correr las muestras a 90 V. durante 1 hora.
5. Con la ayuda del transiluminador deberá observarse una sola banda cuyo tamaño debe corresponder al esperado.

## b. Elaboración del Dot-Blot

### i. Preparación de las muestras

1. Colocar en cajas de hemaglutinación de 96 pozos 80 µL del producto amplificado (o más dependiendo de la eficiencia de la amplificación).
2. Añadir 470 µL de TE con azul de bromofenol o agua bidestilada estéril (o lo necesario para 550 µL finales).
3. Tapar con parafilm la caja y guardarla a 4°C hasta su uso. El DNA en la caja no debe guardarse más de un día porque el líquido tiende a evaporarse.

## ii. Sembrado de las muestras en la membrana

1. Humedecer la membrana en SSPE 10X.
2. Montar en la cámara de Dot-Blot un papel filtro Whatman 3MM, la membrana y finalmente la tapa. Ajustar con los tornillos.
3. Conectar el vacío y colocar 100  $\mu$ L de TE a cada pozo. Dejar 1 min y quitar el vacío.
4. Colocar 50  $\mu$ L de la muestra a cada pozo con una pipeta múltiple de 50  $\mu$ L. Conectar el vacío.
5. Agregar 100  $\mu$ L de TE o agua a cada pozo y desconectar el vacío.
6. Repetir este proceso para las 10 membranas.
7. Dejar secar las membranas a temperatura ambiente sobre un papel filtro.

## iii. Desnaturalización y fijación del DNA

1. Incubar las membranas en NaOH 0.4, 10 min a temperatura ambiente.
2. Neutralizar con SSPE 10X, 10 min a temperatura ambiente.
3. Secar las membranas a 80°C durante 2 h. (sin vacío).
4. Transiluminar cada membrana con luz UV, 3 min a temperatura ambiente.
5. Almacenarlas en una bolsa de plástico a temperatura ambiente hasta su uso.

## c. Marcaje de los oligonucleótidos

Las sondas fueron diseñadas por Derek Middleton y su grupo en el Servicio Regional de Tipificación de Tejidos de Irlanda del Norte para el XII Taller Internacional de histocompatibilidad. Para el locus A se usaron 25 sondas cuyas secuencias se enlistan en el Cuadro 5, y para el locus B se usaron 23 sondas descritas en el Cuadro 6.

El marcaje se realiza con ddUTP-digoxigenina y desoxinucleotidil transferasa (TdT).

La mezcla de la reacción de marcaje varía dependiendo de la concentración a la que viene la sonda sin marcar para que la sonda marcada quede a una concentración final de 1ng/ $\mu$ L.

Concentración de la sonda	40.6 pM/ $\mu$ L	27.5 pM/ $\mu$ L	20 pM/ $\mu$ L	10 pM/ $\mu$ L
Amortiguador	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
CoCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
ddUTP-DIG	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
TdT	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	7.5 $\mu$ L	6.3 $\mu$ L	5 $\mu$ L	0 $\mu$ L
Sonda	2.5 $\mu$ L	3.7 $\mu$ L	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L

1. Descongelar los componentes de la mezcla en baño maría a 37°C a excepción de la TdT que solo debe sacarse del congelador en el momento de ser usada.
2. En microtubos de 0.5 mL adicionar el agua y la sonda. Etiquetar los tubos.
3. Preparar la cantidad apropiada de acuerdo al número de sondas a marcar de la mezcla de amortiguador, CoCl<sub>2</sub>, ddUTP-DIG y TdT, mezclar y centrifugar.
4. Distribuir esta mezcla en los tubos con el DNA.
5. Incubar 1 hora a 37°C en baño maría.
6. Agregar 80  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y almacenar a -20°C.

#### **d. Prehibridación e hibridación**

1. Colocar las membranas donde se sembró el producto del PCR en tubos de 15 mL. Agregar 5 mL de la solución de prehibridación.
2. Prehibridar a 42°C durante 4 horas.
3. Agregar la cantidad correspondiente de la sonda que se vaya a probar e hibridar a 42°C durante toda la noche.
4. Sacar la membrana del tubo y lavarla dos veces con 2X SSPE/0.1% SDS durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Introducir la membrana en una bolsa, añadir 5X SSPE/0.1% SDS y sellar la bolsa sin guardar burbujas en su interior.
6. Sumergir en un baño maría a la temperatura de lavado de la sonda durante 30 min.
7. Lavar con amortiguador 1 durante 5 min a temperatura ambiente.
8. Incubar una vez con amortiguador 2 durante 30 min a temperatura ambiente.
9. Incubar en amortiguador 2 con el anticuerpo anti-DIG 1:10 000 durante 30 min a temperatura ambiente.

10. Lavar 2 veces en amortiguador 1 durante 15 min a temperatura ambiente.
11. Equilibrar con amortiguador 3 durante 5 min a temperatura ambiente.
12. Incubar en amortiguador 3 más CSPD (1:500) durante 5 min a temperatura ambiente.
13. Eliminar el exceso de CSPD.
14. Poner la membrana en una bolsa nueva de hibridación y sellarla.
15. Incubar a 37°C durante 30 min y otros 30 min a T<sub>amb.</sub>

### **e. Exposición y revelado**

1. Exponer las membranas que se colocan en la bolsa de plástico sobre una placa radiográfica dentro de un cassette de exposición de 5 - 60 min a temperatura ambiente. Todo este proceso se realiza en un cuarto totalmente oscuro.
2. Transcurrido el tiempo de exposición, abrir el cassette en completa oscuridad y colocar la radiografía en el recipiente que contiene al revelador durante 2 minutos; enjuagar en agua, pasar la placa a la solución fijadora también durante 2 min, volver a enjuagar la placa en agua y dejar escurrir hasta que se seque.
3. Dependiendo de la intensidad de las manchas se puede aumentar o disminuir el tiempo de exposición de la placa.
4. Analizar los resultados.

### **f. Deshibridación**

1. Lavar en agua destilada durante 3 min a temperatura ambiente.
2. Lavar dos veces en NaOH 0.4 M, durante 20 minutos a 53°C
3. Lavar dos veces en SSPE 2X durante 3-5 min a temperatura ambiente.
4. Conservar las membranas con TE en una bolsa sellada a -20°C.

Cuadro 5: Sondas para el locus HLA-A

Sonda	5' - 3'	T lavado °C	pM usados	Exón	Posición
W	A94 ttc ttc aca tcc gtg tc	50	20	2	22 - 38
A	56R gag agg oct gag tat	46	20	2	163 - 177
B	62LQ tgg gac ctg cag aca	48	20	2	178 - 192
C	62G gac ggg gag aca cgg	52	20	2	181 - 195
O	62RN gac cgg aac aca cgg	52	10	2	181 - 195
D	62EG gag gag aca ggg aaa	46	20	2	184 - 198
Y	A276 ggc cca ctc aca gac t	52	25	2	204 - 219
E	73I tca cag att gac cga	45	20	2	211 - 225
X	A290 ctg acc gag tgg acc t	52	20	2	218 - 233
R	A26 tga ccg agc gaa cct g	52	20	2	219 - 234
F	77S gag agc ctg cgg atc	50	3	2	226 - 240
T	95V cac acc gtc cag agg	48	10	3	7 - 21
P	114EH tat gaa cag cac gcc	46	15	3	67 - 81
G	131R cgc tct tgg acc gcg	52	20	3	121 - 136
H	142TK acc acc aag cac aag	46	20	3	154 - 168
I	149T tgg gag acg gcc cat	50	20	3	169 - 183
J	150V gag gcg gtc cat gcg	60	30	3	172 - 186
K	151R gcg gcc cgt gtg gcg	58	10	3	175 - 189
N	156Q gag cag cag aga gcc	52	10	3	190 - 204
Q	156W gag cag tgg aga gcc	50	5	3	190 - 204
L	161D ctg gat ggc acg tgc	50	20	3	208 - 222
V	A551 tgg agg gca cgt gcg t	54	20	3	209 - 224
M	163R gag ggc cgg tgc gtg	54	10	3	211 - 225
S	A355 ggc gag tgc gtg gag tgg c	68	5	3	214 - 232
U	A357 ggc gag tgc gtg gag ggg c	68	5	3	214 - 232

Cuadro 6: Sondas para el locus HLA-B

Región polim.	Sonda	5' - 3'	T lavado °C	pM usados	Exón	Posición
A	09	gag tcc gag aga gga gcc	60	3	2	122 - 139
A	01	gag gaa gga gcc gcg gcc	64	10	2	128 - 145
A	02	gag gac gga gcc ccg gcc	66	20	2	128 - 145
A	07	gag gat gcc gcc ccg gcc	66	30	2	128 - 145
B	24	ggg aga cac aga tct cca	56	20	2	184 - 201
B	25	gga aca cac aga tct cca	56	3	2	184 - 201
B	03	aca cgg aac atg aag gcc	56	10	2	189 - 206
B	05	aca cag atc ttg aag acc	54	7	2	189 - 206
B	08	aca cag atc tgc aag acc	56	10	2	189 - 206
B	10	gat cta caa gcc cca gcc	58	5	2	194 - 211
B	12	atc tgc aag gcc aag gca	56	20	2	195 - 212
C	13	act gac cga gag agc ctg	60	7	2	216 - 233
C	17	act tac cga gag agc ctg	56	10	2	216 - 233
C	18	act gac cga gtg agc ctg	58	10	2	216 - 233
D	20	agc gga gcg cgg tgc gca	64	20	2	232 - 249
D	21	cgg aac ctg cgc gcc tac	62	20	2	234 - 251
D	22	cgg acc ctg ctc cgc tac	62	15	2	234 - 251
D	23	cgg atc gcg ctc cgc tac	62	20	2	234 - 251
E	27	ctc aca ctt gcc aga gga	56	10	3	4 - 21
E	28	cca gtg gat gta tgg ctg	56	20	3	14 - 31
E	26	ctg cga cct ggg gcc cga	62	30	3	29 - 46
F	29	ctc cgc ggg cat gac cag	64	30	3	57 - 74
F	30	ggc ata acc agt tag cct	54	25	3	64 - 81



Cuadro 7: Patrones de reacción de las sondas para el locus HLA-A

Alelos	Sondas																										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y		
*0101							+			+															+	+	
*0102								+			+																+
*0201				+				+	+														+		+	+	+
*0202				+				+	+																+	+	+
*0203				+				+	+	+															+	+	+
*0204/17				+				+	+																+	+	+
*0205				+				+	+																+		+
*0206/10				+				+	+															+		+	+
*0207/15				+				+	+															+		+	+
*0211				+		+		+	+																+	+	
*0212/13				+				+	+																+	+	+
*0214				+				+	+																+		+
*0216				+				+	+																+	+	+
*0301								+																		+	+
*0302								+																		+	+
*11								+																			+
*2301				+				+																	+		+
24.1				+				+																	+		+
*2404				+				+																	+		+
*2406				+				+																	+		+
*2407				+				+																	+		
*2501								+	+		+																+

Cuadro 6 (Continuación)

Alelos	HLA-A																									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	
*2601/02							+	+				+	+		+	+										+
*2603/05							+	+				+	+		+											+
*2604							+	+							+	+	+									+
*68							+								+	+							+		+	
*6901							+								+						+		+		+	
*29		+					+				+									+		+				
*3001	+						+								+							+		+		+
*3002	+						+								+								+		+	+
*3003							+								+								+		+	+
*3004/05	+						+								+	+							+		+	+
*31	+				+		+				+												+			
*3201							+	+			+												+	+	+	+
*33							+	+			+				+								+			
*3401							+	+							+	+							+		+	
*3402							+	+							+								+		+	
*3601							+			+											+		+	+	+	+
*4301	+						+	+				+			+	+										+
*6601							+	+				+			+	+	+									+
*6602							+	+							+	+	+			+						+
*7401							+																+	+	+	+
*8001							+												+			+		+	+	+



Cuadro 7 (Continuación)

HLA-B	Sondas																																																					
	A						B						C						D						E						F																							
Alelos	01	02	07	09	03	24	25	05	08	10	12	13	17	18	20	21	22	23	26	27	28	29	30	01	02	07	09	03	24	25	05	08	10	12	13	17	18	20	21	22	23	26	27	28	29	30								
*4801				+		+							+			+																																						
*4802				+		+							+			+																																						
*4901						+																		+																														
*51				+									+																																									
*52				+																																																		
*5301				+									+																																									
*55/56						+																																																
*5701				+		+																																																
57.1				+		+																																																
*5801				+		+																																																
*5802/03				+		+																																																
*5901						+																																																
15.1				+																																																		
*1502				+																																																		
*1503						+																																																
*1506/25				+		+																																																
*1508				+																																																		
*1509						+																																																
*1510/18						+																																																
*1511/28						+																																																
*1513				+																																																		
*1515				+																																																		
*1516				+		+																																																
*1520				+																																																		
*1521				+																																																		
*1522																																																						
*1523						+																																																
*1524				+																																																		
*1529						+																																																
*7301						+																																																
*7801				+																																																		
*7802				+																																																		

## 5. Tipificación mediante PCR-ARMS / PCR-SSP para el locus HLA-A (60)

Esta parte del trabajo se realizó utilizando las mezclas del equipo de tipificación de genes clase I por ARMS-PCR diseñado para el 12° Taller internacional de histocompatibilidad (60). Para el locus HLA-A el equipo comprende 32 mezclas.

### a. Amplificación del DNA

Para cada DNA por cada mezcla a amplificar preparar la siguiente mezcla:

Glicerol	0.5 µL
H <sub>2</sub> O	4.17 µL
TDMH	5 µL
Taq	0.08 µL
DNA	0.25 µL
Mezcla de los iniciadores	10 µL

1. Descongelar los componentes de la mezcla en un baño maría a 37°C excepto la enzima que se debe dejar en el congelador hasta el momento de usarse.
2. Colocar en estos tubos 10 µl de cada una de las mezclas de iniciadores que se van a utilizar. En el Cuadro 9 se indican las mezclas y las condiciones para la amplificación de cada una.
3. En otro tubo preparar la mezcla de glicerol, agua, TDMH y Taq polimerasa en la cantidad necesaria para la cantidad de tubos que se van a amplificar, agitar y centrifugar.
4. Distribuir esta mezcla en tubos en los que previamente se ha colocado la cantidad apropiada del DNA para el número de mezclas a amplificar. Agitar y centrifugar.
5. Distribuir la mezcla en los tubos con los iniciadores, agregar una gota de aceite mineral y centrifugar durante 10 seg antes de introducir en el termociclador.

### i. Amplificación de las muestras

Se empleó un termociclador MJ Research PTC-200 con los siguientes programas de amplificación. El programa usado depende de la temperatura óptima que se determinó para cada mezcla.

63°:

96°C 1 min  
96°C 30 seg ←  
63°C 1 min ————  
72°C 45 seg ————  
72°C 10 min ————

35 ciclos

65°:

96°C 1 min  
96°C 30 seg ←  
65°C 1 min ————  
72°C 45 seg ————  
72°C 10 min ————

35 ciclos

67°:

96°C 1 min  
96°C 30 seg ←  
67°C 1 min ————  
72°C 45 seg ————  
72°C 10 min ————

35 ciclos

## b. Electroforesis en gel de agarosa (58)

Durante la amplificación se prepara un gel de agarosa al 2% en 1X TAE.

1. Colocar una alícuota de 10  $\mu$ L de cada una de las reacciones realizadas en una placa de hemaglutinación.
2. Añadir 5  $\mu$ L de LB a cada uno.
3. Aplicar el DNA amplificado de cada muestra cuidadosamente en cada uno de los pozos colocando en uno de ellos  $\phi$ X174 digerido con HaeIII.
4. Correr a 100 V durante 60 min.
5. Colocar el gel directamente sobre un transiluminador UV 254nm.
6. Fotografíar.
7. Analizar los resultados.

Cuadro 9: Mezclas de iniciadores y temperaturas de alineación para PCR-ARMS/SSP

Mezcla	Especificidad	Producto (pb)	63°C	65°C	67°C
1 A	A*01	5774		+	
2 A	A*3801	563	+		
3 A	A*02	813		+	
4 A	A*03	626		+	
5 A	A*23	555		+	
6 A	A*24	555		+	
7 A	A*25	398		+	
8 A	A*26	400		+	
9 A	A*25/26/34/66	438			+
10 A	A*34/66	417			+
11 A	A*4301	440	+		
12 A	A*11	518		+	
13 A	A*68/6901	445		+	
14 A	A*6801/3402	426	+		
15 A	A*6802	623		+	
16 A	A*6901	405			+
17 A	A*29	515		+	
18 A	A*30	560		+	
19 A	A*31	418		+	
20 A	A*3201	421		+	
21 A	A*33	461		+	
22 A	A*3201/7401	494		+	
23 A	A*29/31/33/7401	414		+	
24 A	A*8001	543	+		
25 A	A*02/23/24/68/69	446		+	
26 A	NO A*02/23/24/68/69	446		+	
27 A	A*0202	580	+		
28 A	A*0203	553	+		
29 A	A*0212/13	574		+	
30 A	A*0207	404			+
31 A	A*0202/05/08/14	479		+	
32 A	A*0201/04/06/07/09/10/11/14	574		+	

## 6. Asignación de alelos

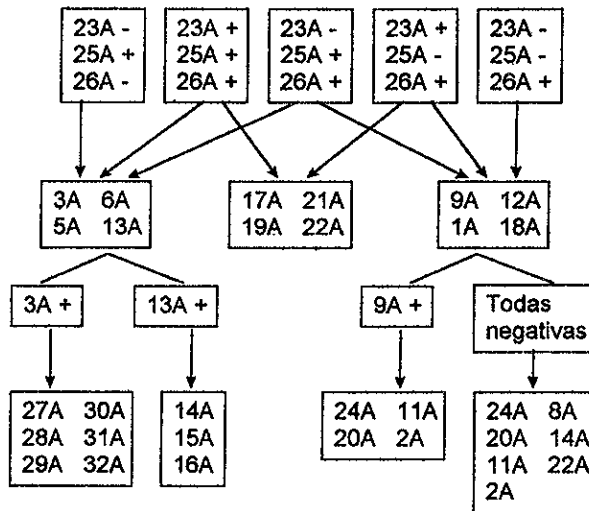
La interpretación de los resultados de la tipificación PCR-SSOP se hace comparando las reacciones de cada DNA con cada una de las sondas con los patrones de reacción, considerando que cada individuo puede tener dos alelos distintos en cada locus. Para mayor exactitud se utiliza además el programa de computadora para tipificación SSO de F. Williams. Por medio de este sistema se interpretaron 100 muestras de seris. Todos los que fueron tipificados por PCR-ARMS se retipificaron por este sistema, con el objeto de validar las asignaciones por ambos métodos.

En el caso de la tipificación PCR-ARMS, la asignación de cada uno de los alelos se hace de acuerdo a la presencia o ausencia de bandas del tamaño apropiado para cada una de las mezclas. Todas las mezclas incluyen iniciadores de control interno que dan un producto de 256 pb. Para que el resultado de una mezcla se tome en consideración, la banda control deberá estar siempre presente ya que funciona como control de la amplificación. Según el protocolo original, las 32 mezclas debían probarse simultáneamente con cada DNA para obtener la tipificación final, pero con el objeto de ahorrar reactivos y enzima se diseñó un procedimiento secuencial de manera que los resultados de las primeras reacciones determinaran cuales se realizarían a continuación (Figura 15). De esta manera no es necesario efectuar todas las mezclas para cada una de las muestras. Por medio de este proceso se logró la tipificación de los DNAs de 27 individuos.

En la Figura 15 se muestra la secuencia en que se probaron las distintas mezclas de iniciadores para la PCR-ARMS de manera que se optimizara el número de reacciones a realizar. Como primer paso se realizaron las reacciones de las mezclas 23A, 25A y 26A y dependiendo de los resultados de estas se seleccionaba el siguiente juego de mezclas a probar y dependiendo de los resultados de estas reacciones podía ser necesario un tercer juego de reacciones para llegar a la tipificación definitiva.



Figura 15: Secuencia de prueba de las mezclas de iniciadores



Los números que se indican corresponden a los códigos de identificación de las mezclas de iniciadores que se muestran en el Cuadro 9.

La asignación de los alelos se realizó de acuerdo con los resultados del PCR-ARMS y PCR-SSP. En los casos en que existían ambigüedades se consultaron los árboles genealógicos para analizar cuidadosamente la segregación, de esta forma si alguno de los alelos involucrados en la ambigüedad no pudo provenir de uno de los padres se le descarta. En algunos casos persistió la ambigüedad ya sea porque los alelos presentes en la familia no lo permitían o porque el grado de resolución no permite la definición del alelo.

## 7. Armado de haplotipos

Para armar los haplotipos se consideraron también los resultados de clase II de los loci HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1, además de los promotores de DQA y DQB. Estos datos fueron determinados en un trabajo previo por el grupo del Departamento de Inmunogenética. Tomando estos resultados en conjunto con los árboles genealógicos se analizó cuales de los alelos segregaban juntos de los padres a los hijos de cada familia para poder asignar inequívocamente cada haplotipo.

## 8. Análisis estadístico

Las frecuencias génicas se obtuvieron mediante cuenta directa para las familias y por medio de la fórmula de Haldane para los individuos no relacionados (61).

$$Fg = 1 - \sqrt{1 - A}$$

Donde Fg es la frecuencia génica y A es la frecuencia del alelo en la población determinada como porcentaje.

### a. Distancias genéticas

Las distancias genéticas se obtuvieron a partir de las frecuencias génicas de los distintos alelos en cada uno de los loci, utilizando los datos publicados para clase I y clase II entre las siguientes poblaciones: china(62), japonesa (63), inuit (Alaska)(64), toba (Argentina), wichi (Argentina) (65), indios del noroeste de argentina (66), terena (Brasil) (67), guaraní (Brasil) (68), kaingang (Brasil) (69), lacandones (México) (70), mestizos mexicanos (71), seri (México) (72), bari (Venezuela) (73), mestizos venezolanos (74) y warao (Venezuela) (75).

Las distancias genéticas se calcularon utilizando el programa DISPAN que calcula las distancias basándose en las diferencias de frecuencias génicas por el método descrito por Cavalli-Sforza y Bodmer (76). Las fórmulas implicadas en el cálculo de las distancias genéticas se describen a continuación.

$$\begin{aligned} \cos \Theta_{jk} &= \sum \sqrt{P_{ij} \times P_{jk}} \\ d_{jk} &= \sqrt{1 - \cos \Theta_{jk}} \end{aligned}$$

$P_{ij}$ : Frecuencia génica de un alelo dado en la población j.

$P_{ik}$ : Frecuencia génica de un alelo dado en la población k.

d: Distancia genética.

Estos resultados se expresan gráficamente como un árbol filogenético en el que la longitud de las ramas que separan una población de otra representan la distancia genética entre ellas (77).

## VII. RESULTADOS

---

A continuación se muestran los resultados de este trabajo:

En el Cuadro 10: Características generales de los Seris, se muestran las características generales de los seris obtenidas a partir de los cuestionarios realizados a todos los individuos que participaron en el estudio.

Se debe notar que la gran mayoría de los participantes en el estudio (92%) son hijos de ambos padres seris, lo que nos indica que este grupo se mantiene en un relativo aislamiento y esta endogamia y el bajo mestizaje que resulta de ella, hace que los seris continúen teniendo un perfil genético diferenciado de la población general de mestizos mexicanos e incluso de otras poblaciones indígenas de México.

Los problemas de salud más sobresalientes entre ellos son los de carácter infeccioso, debido a las pobres condiciones de higiene en las que viven, y llama la atención que hay una frecuencia elevada de algunas enfermedades crónicas como la hipertensión y los padecimientos alérgicos.

No se encuentran entre ellos los elementos católicos comunes a otras poblaciones indígenas porque nunca fueron propiamente conquistados y evangelizados. Como resultado de la influencia proveniente de los Estados Unidos, 90% de ellos se declaran protestantes. El 21% de alcoholismo reportado, no representa un problema de adicción sino que se refiere a la ingesta ocasional de alcohol.

## Cuadro 10: Características generales de los Seris

Familia lingüística	Hokano-Coahuitleca
Ambos padres seris	92%
<b>Poblado</b> (nacimiento-residencia)	
Desemboque	47% - 81%
Punta Chueca	25% - 19%
Isla de Tiburón	7%
Hermosillo	7%
Bilingües (seri-español)	96%
Mujeres/Hombres	65% 35%
Edad	X= 38 años (d.s. 18)
Religión Protestante	90%
Tabaquismo	19%
Alcoholismo	21%
<b>Problemas de salud</b>	
Infecciones virales	75%
Infecciones respiratorias	52%
Hipertensión	38%
Alergias	35%
Parasitosis	23%
Enf. reumáticas	15%
Enf. urinarias	13%
Diabetes tipo II	8%

En la Figura 16: Árboles genealógicos de los individuos incluidos en el estudio, se esquematizan los árboles genealógicos de los 91 individuos con relaciones familiares entre ellos, generados en base a los datos suministrados en los cuestionarios.

Como se ve, debido a las características primordialmente endogámicas de la población, los individuos guardan gran relación familiar unos con otros y los árboles familiares están muy interrelacionados. En algunas familias se logran estudiar hasta cuatro generaciones (familias 1, 2 y 3). Esto nos resulta muy útil, ya que trazando la segregación de los alelos de los distintos loci nos es posible dilucidar los haplotipos que se encuentran en la población.

Figura 16: Árboles genealógicos de los individuos incluidos en el estudio

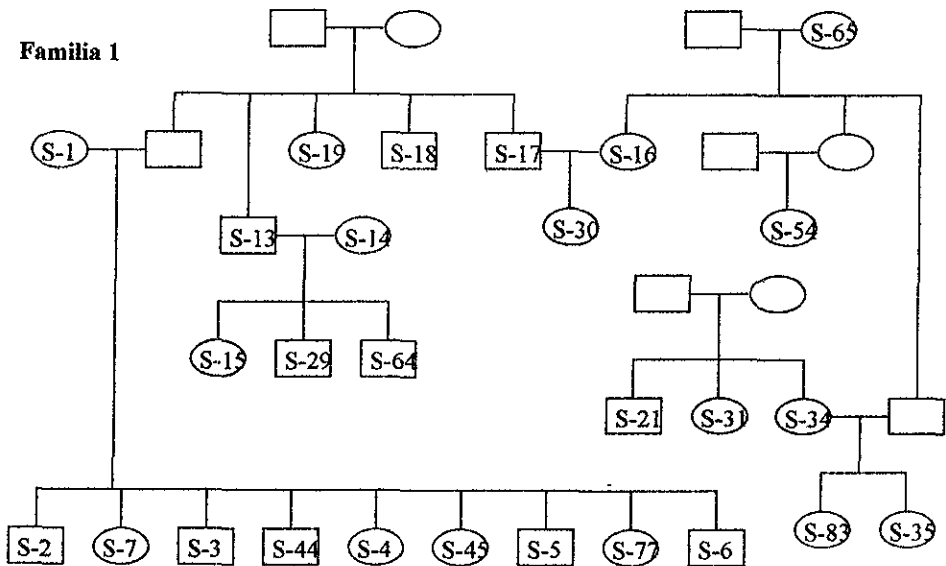


Figura 16 (Continuación)

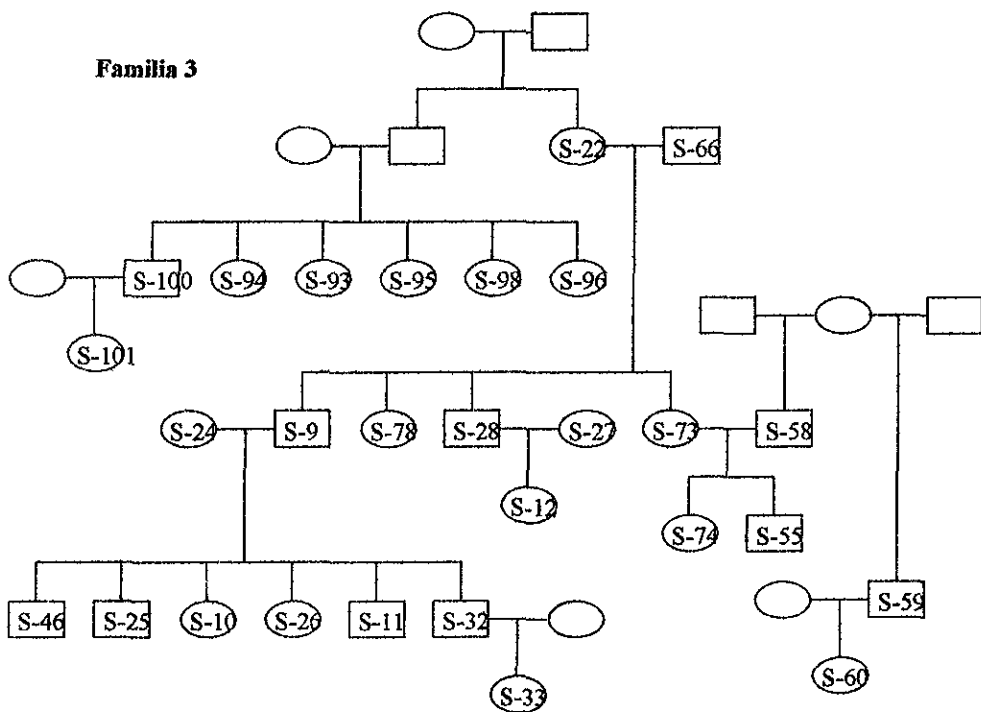
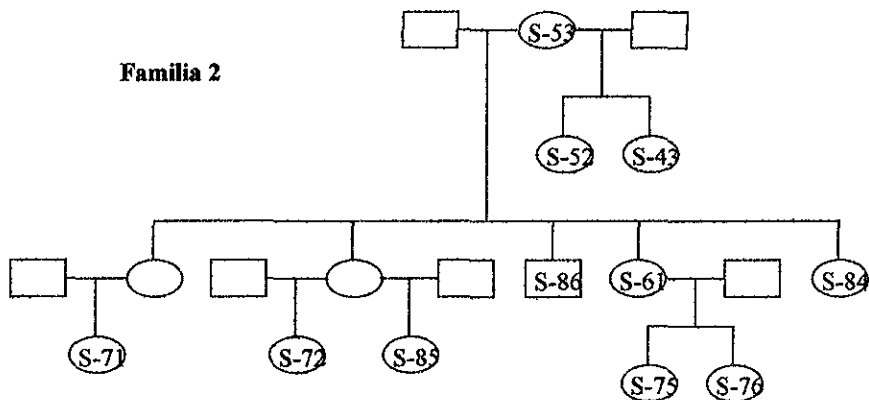
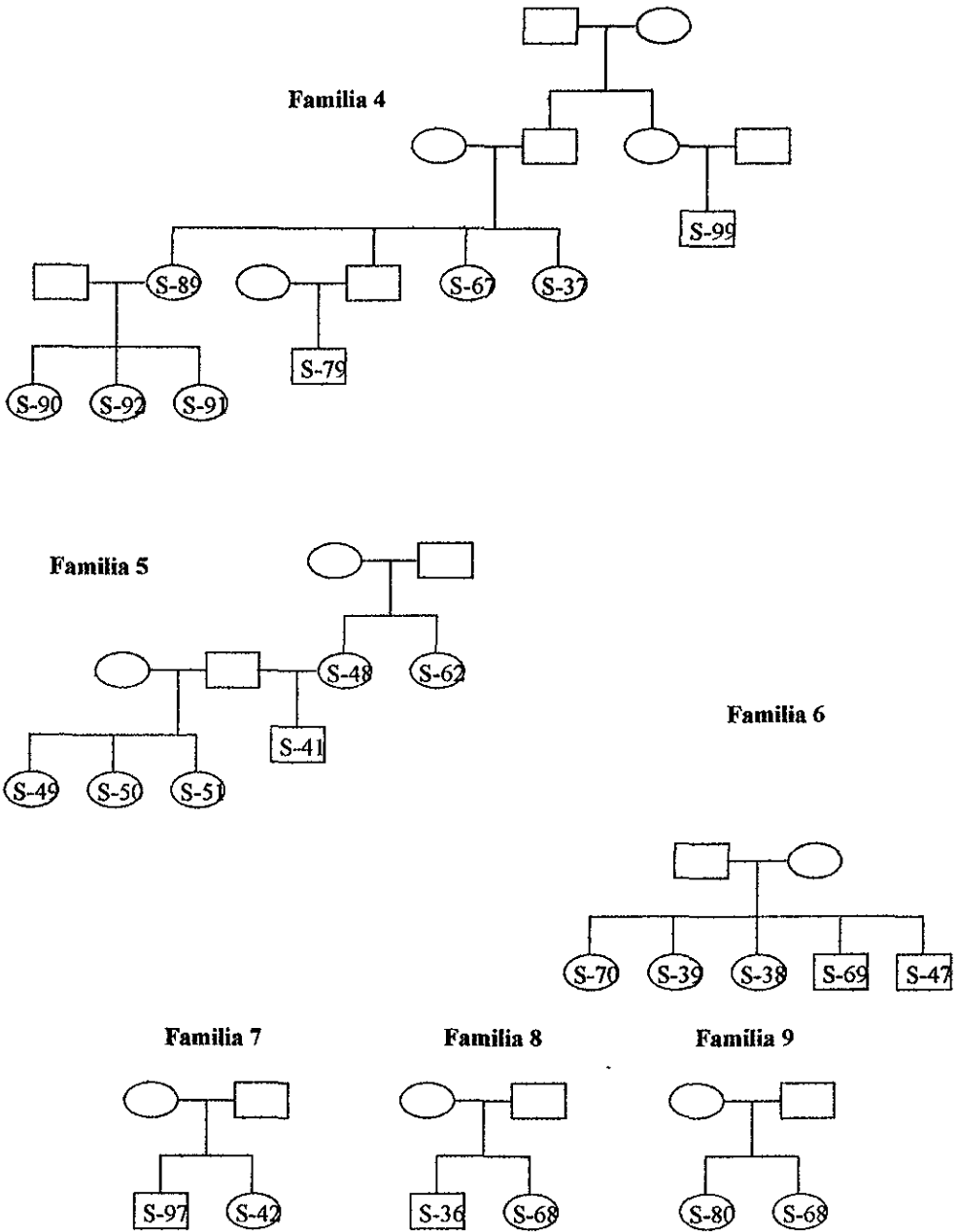


Figura 16 (Continuación)



Además de los individuos comprendidos en estas familias se estudiaron 11 individuos más no relacionados familiarmente con el resto.

En el Cuadro 11: Tipificación de los loci A y B en Seris, se presenta el sumario de los resultados de la tipificación para cada uno de los sujetos de estudio mediante las técnicas de PCR-ARMS / PCR-SSOP.

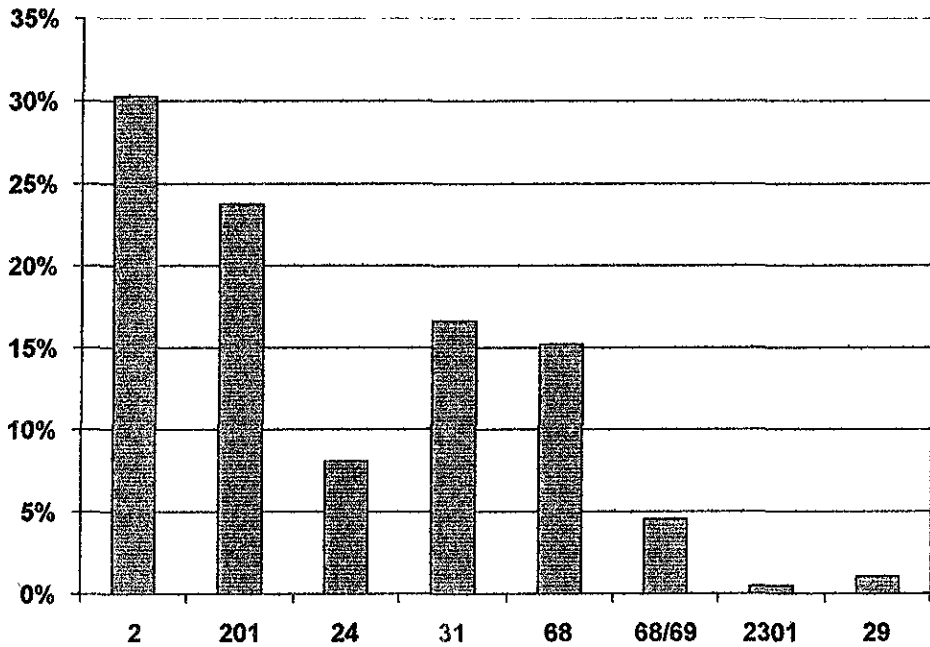
Ya desde estos datos crudos salta a la vista la alta frecuencia de individuos que son portadores de los alelos A\*0201 y B\*3501, que son los alelos prevalentes para los loci A y B respectivamente en esta población. En el caso de los alelos A\*02 estos no tienen asignado un subtipo, por lo que podrían ser también A\*0201 u algún otro subtipo del A2.

En los casos en que el resultado se expresa como dos números separados por una diagonal como A\*68/69 o B\*3501/12, esto quiere decir que en dichos casos no fue posible discernir entre los alelos por las combinaciones posibles de alelos en los patrones de reacción (Cuadro 7 y Cuadro 8). Verificando la segregación de alelos dentro de una misma familia, algunas de estas indeterminaciones pudieron ser resueltas, pero otras debieron permanecer sin resolver.

En la Figura 17: Frecuencias génicas de los alelos HLA-A en Seris, se muestran gráficamente las frecuencias génicas estimadas por cuenta directa a partir de los datos para el locus A, y en la Figura 18: Frecuencias génicas de los alelos HLA-B en Seris, la gráfica equivalente para el locus B. La restricción del polimorfismo es evidente, pues solo se encuentran 8 alelos para el locus A y 12 para el B siendo los principales A\*02, A\*0201, A\*31, A\*68, A\*24, B\*40, B\*3501, B\*3512 y B\*51. Es notable además que se encontró una frecuencia de 2.02% para el alelo B\*27052, ya que aunque se halla en algunas poblaciones indias del norte del continente, no se encuentra en Sudamérica y está ausente también en poblaciones mexicanas nativas como nahuas, mazahuas, tarahumaras y mixtecos. Las implicaciones de estos hallazgos se discutirán más adelante.

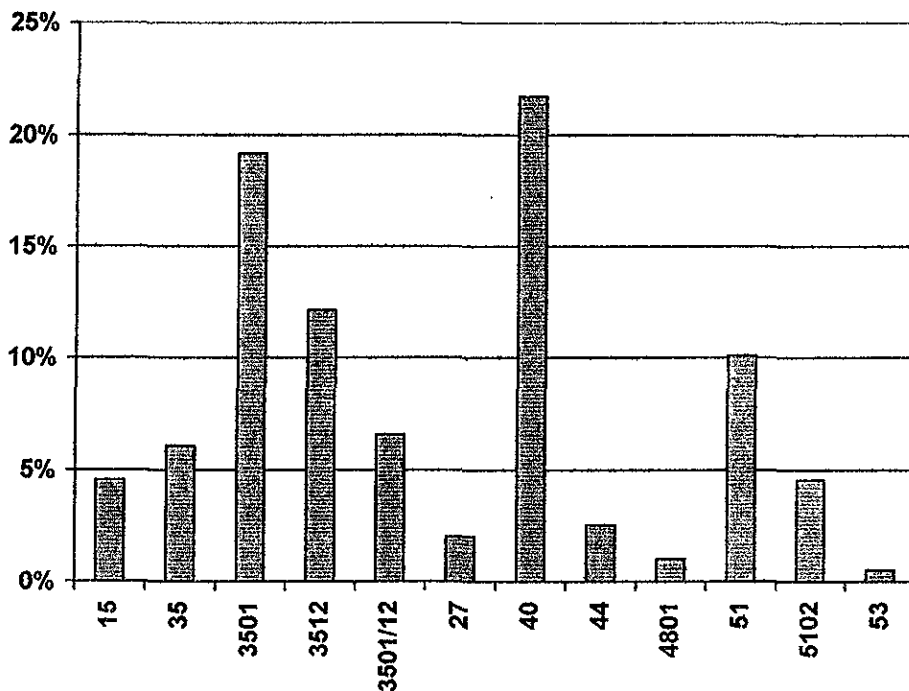


Figura 17: Frecuencias génicas de los alelos HLA-A en Seris



HLA-A	Frecuencia génica
2	30.30%
201	23.74%
24	8.08%
31	16.67%
68	15.15%
68/69	4.55%
2301	0.51%
29	1.01%

Figura 18: Frecuencias génicas de los alelos HLA-B en Seris



HLA-B	Frecuencia génica
15	4.55%
35	6.07%
3501	19.19%
3512	12.13%
3501/12	6.57%
27	2.02%
40	21.72%
44	2.53%
4801	1.01%
51	10.10%
5102	4.55%
53	0.51%

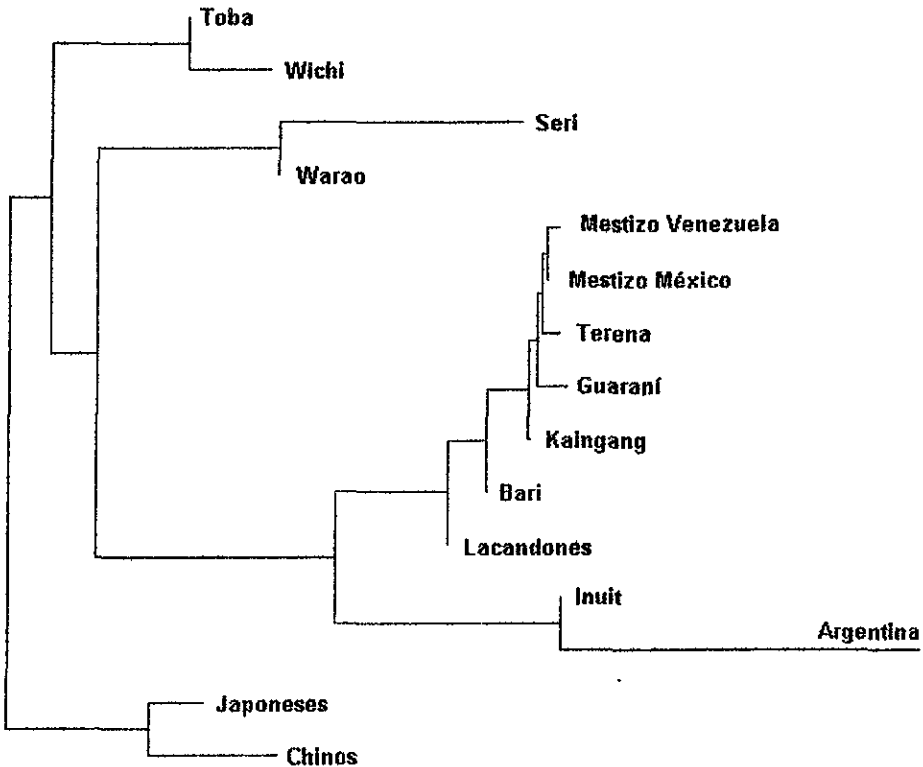
En el Cuadro 12: Haplotipos clase II – clase I presentes en la población Seri, se muestran los haplotipos formados a partir de los resultados generados por este estudio y datos de clase II previamente generados en el laboratorio a cargo de la Dra. Gorodezky, en base a las relaciones familiares entre los individuos. Los haplotipos clase II que se pueden identificar son tan solo 7, pero al agregar los datos de la tipificación de clase I el número se incrementa hasta 26.

**Cuadro 12: Haplotipos clase II – clase I presentes en la población Seri**

DRB	QAP	DQA	QBP	DQB	A	B
407	3.1	3011	4.1	302	2	35
407	3.1	3011	3.21	302	2	35
407	3.1	3011	3.21	302	201	35
407	3.1	3011	3.21	302	24	35
407	3.1	3011	3.21	302	24	15
407	3.1	3011	3.21	302	31	51
407	3.1	3011	3.21	302	68	35
407	3.1	3011	3.21	302	68	4801
407	3.1	3011	3.21	302	68	15
701	2.1	201	2.1	201	2	44
802	4.2	401	4.1	402	2	40
802	4.2	401	4.1	402	2	35
802	4.2	401	4.1	402	201	40
802	4.2	401	4.1	402	201	35
802	4.2	401	4.1	402	24	35
802	4.2	401	4.1	402	31	51
802	4.2	401	4.1	402	68	40
1100	4.1	501	3.1	301	68	40
1402	4.1	501	3.1	301	2	35
1402	4.1	501	3.1	301	2	40
1402	4.1	501	3.1	301	201	35
1402	4.1	501	3.1	301	201	40
1402	4.1	501	3.1	301	24	35
1402	4.1	501	3.1	301	31	7301
1402	4.1	501	3.1	301	68	4801
404	3.1	3011	3.21	302	201/68	

En la Figura 19: Distancias genéticas entre distintas poblaciones, se muestra el árbol filogenético que relaciona las poblaciones que se compararon. Se tomó como primera rama del árbol la división de chinos y japoneses de las demás poblaciones, para evidenciar la separación de las poblaciones orientales de las que provienen las nativas de América. Los mestizos de México y de Venezuela se incluyeron con fines de comparación.

Figura 19: Distancias genéticas entre distintas poblaciones



## VIII. DISCUSIÓN

---

Los resultados de este trabajo se agrupan en dos categorías: primeramente el desarrollo metodológico de las técnicas de tipificación molecular para los alelos de clase I, y por otro lado los resultados del estudio de la población seri. Valga mencionar que los hallazgos de frecuencias de los loci A y B de este trabajo han sido ya parcialmente publicados (72,80).

Los resultados entre las técnicas de PCR-SSP / ARMS y PCR-SSOP mostraron una correlación completa de una con otra sin que hubiese ninguna discrepancia entre ellas. Estas técnicas de análisis molecular son de una gran precisión y son altamente reproducibles. Además tienen la gran ventaja sobre las técnicas serológicas de que no están limitadas por la existencia de los antisueros apropiados, pues las sondas e iniciadores utilizados en las técnicas moleculares pueden sintetizarse en las cantidades requeridas y tantas diferentes secuencias como hagan falta. Además los patrones definidos de reacción permiten el diseño de programas de interpretación, lo que reduce el carácter subjetivo de la interpretación de los resultados.

La técnica de PCR-ARMS presenta la ventaja de que permite obtener resultados de manera más rápida que la hibridación con sondas, ya que sólo es necesario amplificar las muestras con la reacción de PCR para cada una de las mezclas y observarlas en un gel para poder asignar, pero al mismo tiempo se requiere una gran cantidad de reactivos para amplificar cada una de las muestras un número de veces considerable. La secuencia de reacciones de amplificación que se describe en la Figura 15 permite reducir el número de amplificaciones, eliminando aquellas que gracias a las anteriores sabemos serán negativas, pero esto toma más tiempo y pueden perderse variantes nuevas de los alelos que darían un patrón extraño de reacción.

La técnica de PCR-SSOP por otra parte, tiene la ventaja de que es más económica, ya que en una sola membrana se pueden procesar simultáneamente 96 muestras y es posible trabajar más de una membrana a la vez. Sin embargo, tiene la desventaja de que no es conveniente para un número de muestras reducido o para resultados que se requieren de manera inmediata por el tiempo que consume, por lo que en el caso de estudios de histocompatibilidad para buscar posibles donadores, pueden ser más convenientes las técnicas basadas en iniciadores específicos. La técnica de PCR-SSOP tiene además la ventaja de que las membranas pueden conservarse y pueden rehibridarse con nuevas sondas si así se requiere.

Un problema particular que se presentó durante este estudio, fue que las mezclas de tipificación de ARMS-PCR sufrieron varias descongelaciones y congelaciones sucesivas, lo cual al parecer ocasionó que se desajustaran las concentraciones de los iniciadores y que hubiera muchos problemas para poder amplificar. Este problema no se podía solucionar debido a que como las mezclas de iniciadores se encontraban ya preparadas, no era posible leer los iniciadores en el espectrofotómetro para ajustarlos manualmente. Por esta razón sólo se estudiaron 27 muestras mediante esta técnica. Sin embargo, estas tipificaciones fueron congruentes con las obtenidas por PCR-SSOP lo que demuestra la especificidad y reproducibilidad de ambos métodos.

Mediante el uso de estas técnicas moleculares de tipificación de clase I, se puede alcanzar desde una resolución similar a la que se obtiene mediante el uso de técnicas serológicas hasta una definición al nivel de alelo; es posible resolver ambigüedades que la serología no permite determinar como es el caso de los alelos HLA-B\*27, que serológicamente son indistinguibles de HLA-B\*7301, pero que molecularmente sí se pudieron discernir. Además se identificaron algunos subtipos del locus A como son: A\*201 y A\*2301 que no se pueden determinar por serología, y del locus B se definieron B\*3501, B\*3512, B\*4801 y B\*5102 que tampoco se pueden identificar por las técnicas serológicas tradicionales, pues estas solo permiten discernir las especificidades A2, A23, B35, B48 y B51 para estos alelos, lo cual resulta insuficiente si consideramos que para el A2 existen 22 variantes y para el B35

El grado de resolución que se puede alcanzar depende en muchos casos de la combinación de alelos presentes y de las sondas o sistema que se usa. En este caso los métodos utilizados nos

brindan una resolución baja, dándonos en la mayoría de los casos sólo la especificidad serológica, aunque en algunos casos si se llegó hasta la definición del alelo.

Las poblaciones indígenas de México resultan un caso muy interesantes de estudiar desde el punto de vista de la antropología molecular, ya que los estudios que se han realizado hasta la fecha en poblaciones de norte y Sudamérica muestran perfiles genéticos marcadamente distintos (40,41), muchos alelos nuevos se generaron en las poblaciones en el paso hacia Sudamérica cuando el continente fue poblado originalmente (42), pero no se tienen muchos datos acerca de la manera como este proceso fue desarrollándose y en este sentido, las poblaciones en México podrían darnos pistas en este proceso. En este sentido, los Seris muestran un perfil genético intermedio entre lo que se ha reportado en poblaciones de norte y Sudamérica. Por ejemplo, el alelo HLA-B\*27, en las poblaciones de Norteamérica se encuentra con frecuencias muy altas (16% en inuits, 10.5% en tlingits), mientras que en las poblaciones de Sudamérica (y serológicamente en otras poblaciones mexicanas) el alelo está ausente del todo, de modo que los Seris, en los que este alelo se encuentra presente aunque en una frecuencia baja (2%), parecieran representar un paso intermedio en la modificación del perfil genético.

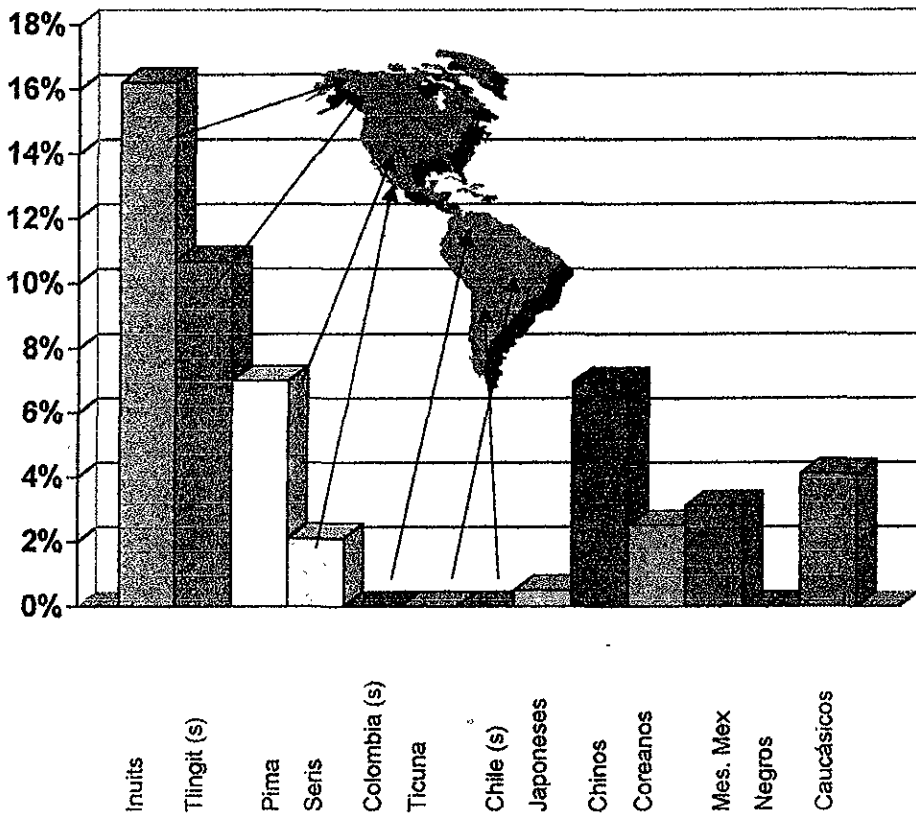
En la Figura 20 se muestra la frecuencia génica de alelos B\*27 en distintas poblaciones. Aquellas marcadas "(s)" fueron determinadas por serología. Llama poderosamente la atención que en poblaciones esquimales como los inuits y los tlingit la frecuencia de B\*27 sea extremadamente alta (superior al 16%) y conforme se estudian poblaciones más hacia el sur del continente, la frecuencia de estos alelos disminuye hasta que en Sudamérica está ausente del todo (64,41).

Ya que el proceso de colonización original del continente americano fue precisamente desde el norte hacia el sur, esto sugiere que estos alelos fueron desapareciendo paulatinamente conforme los grupos humanos se desplazaban, posiblemente debido a que existió una selección negativa contra este alelo en los nuevos ambientes a que se enfrentaban los distintos grupos en su migración.

La modificación del perfil genético de las poblaciones conforme se desplazan hacia el sur puede ser debida a procesos de selección natural dirigida por patógenos locales, pero en unas condiciones como en las que se desarrolló la colonización de América no se pueden descartar el

efecto fundador y la deriva génica. En el efecto fundador un pequeño grupo se desprende de una población mayor y forma su propia comunidad, este grupo puede llevar en él individuos que tienen un alelo raro en la población original, con lo que en la nueva población estos alelos pueden tener frecuencias más elevadas. Otra alternativa es que algunos alelos presentes en la población original desaparezcan o disminuyan su frecuencia y esto depende de la composición de la población que se desprende de la original. La deriva génica también puede jugar un papel importante en la variación de los alelos con frecuencias bajas, ya que en estos casos el azar es muy importante pues disminuye la probabilidad de que dichos alelos se transmitan a la descendencia (36).

Figura 20: Frecuencia génica de B\*27 en distintas poblaciones





Es posible que la disminución paulatina en la frecuencia de B\*27 del norte del continente, donde la frecuencia es muy alta, a Sudamérica, donde está ausente, se deba a una combinación del efecto fundador (donde un pequeño grupo, con menor frecuencia de B\*27, se separaba y emigraba hacia el sur) y de la deriva génica, que podría actuar disminuyendo la frecuencia de un alelo, siempre que no exista una presión selectiva que promueva el mantenimiento del alelo debido a que presente alguna ventaja selectiva en un medio particular (36).

El alelo B\*27 presente en los seris fue secuenciado recientemente por Angélica Olivo, miembro del laboratorio de la Dra. Gorodezky, y demostró que se trata de la variante B\*27052 (datos no publicados). Este alelo es uno de los considerados como fundadores, es decir uno de los alelos que se encontraban presentes en la población original de colonizadores del continente americano (40)

Los alelos A\*0201, B\*3501 y B\*4801, además del B\*27052, también se consideran fundadores. Los alelos A\*24, A\*68, A\*31, B\*15 y B\*40 presentes en los seris no se resolvieron hasta tener la definición necesaria para determinar si también se trata de alelos fundadores (A\*2402, A\*68012, A\*31012, B\*1501 y B\*4002 respectivamente) o de variantes originadas a partir de estos. Para determinarlo será necesario recurrir a la subtipificación. Si estos resultaran ser efectivamente las variantes correspondientes a los alelos fundadores, el único que estaría ausente sería el B\*52012 (40).

Una característica particular del alelo B\*4801 identificado en los seris y otras poblaciones amerindias (su frecuencia aumenta en las poblaciones sudamericanas) es que debido a una alteración expresan treonina en la posición 245, mientras que los demás alelos expresan alanina; esta sustitución reduce la afinidad por el co-receptor CD8 de las células T, por lo que podría esperarse que hubiera una deficiencia en la activación de células T citotóxicas. Sin embargo esto no se ha observado y de hecho el B48 es uno de los alelos más comunes entre determinadas poblaciones en Sudamérica, lo cual sugiere que podría no sólo no ser deficiente en la presentación de péptidos, sino que incluso podría representar una ventaja selectiva (40,78).

Un hallazgo interesante es que la diversidad de clase I es mayor para el locus B que para el A en los seris (8 alelos en locus A, 12 en locus B), esto es así también para otras poblaciones amerindias: Guaraní, Kaingang, Toba, Wichi, Pilaga, que muestran números similares (41,45,79). En estas poblaciones sudamericanas la generación de nuevos alelos de locus B ha sido muy importante, ya que el número de nuevos alelos encontrados es mucho mayor para locus B que para A o C. Probablemente esto significa que la evolución ha sido más rápida para locus B, por lo que se ha propuesto que este locus puede tener una frecuencia intrínseca de recombinación (el mecanismo más común por el que se generan nuevos alelos es la recombinación interalélica) mucho mayor que el locus A. Alternativamente se ha sugerido que la selección tiende a conservar las variantes funcionales de A, suprimiendo así la diversificación de este locus o bien que B tiene un porcentaje más alto de recombinaciones funcionales (41).

Conjuntando los resultados de la tipificación de clase I con datos de la tipificación de clase II previamente generados en el laboratorio de la Dra. Gorodezky (80) y con los árboles familiares para determinar las relaciones, fue posible ensamblar los haplotipos que nos muestran que alelos se encuentran juntos en el mismo cromosoma, e interesantemente, cuando los haplotipos se ensamblan considerando solamente clase II, se encuentra que la población parece ser muy homogénea. Esta conclusión surge de que sólo se observan 7 haplotipos. Sin embargo, cuando también se consideran los datos de clase I en los haplotipos, el número de estos se incrementa significativamente hasta 26. Esto muestra que en seris la variabilidad es notablemente mayor para clase I que para clase II, ya que las variantes se fijan en una población de acuerdo con las ventajas selectivas que pueden representar (como se explicó en la sección Significado biológico y evolución del polimorfismo en clase I, p. 30). La mayor variabilidad presente en clase I puede indicar que ha estado sujeta a una mayor presión selectiva que la de clase II. Posiblemente debido a la acción de los virus, que son patógenos intracelulares para los que es importante el reconocimiento mediante la presentación por clase I.

Los seris constituyen un grupo aislado y endogámico como se manifiesta en las características generales que se muestran en el Cuadro 10, y esto queda confirmado, al comparar con otras poblaciones de las que se encuentran notablemente separados en cuanto a su perfil

genético. Más aún, en el árbol filogenético de la Figura 19 se observa que se encuentran en una rama separada, aislados de las otras poblaciones con las que se les comparó.

De acuerdo con estos resultados, entre las poblaciones comparadas la relación genética más cercana es con los warao de Venezuela (74) que, al igual que los seris, habitan en una región costera. Este hecho resulta sumamente interesante porque puede sugerir, que la semejanza genética entre ambas poblaciones puede relacionarse con el ecosistema en el que habitan, y posiblemente han estado sometidos a presiones similares por parte de patógenos parecidos y por eso mostrarían mucha más similitud entre ellos que con otras poblaciones geográficamente mucho más cercanas. Este hecho también se puede observar entre los bari y los lacandones, quienes también habitan ecosistemas selváticos similares y a pesar de estar separados geográficamente son relativamente cercanos, lo que parece favorecer aún más esta hipótesis.

Como era de esperarse, en la gráfica de distancias genéticas, las poblaciones orientales (japoneses y chinos) se agrupan muy cercanas unas de otras y separadas del resto de las poblaciones incluidas. Llama la atención la distancia muy corta entre Toba y Wichi (65), las poblaciones indígenas de Argentina que sin embargo están muy alejadas de la población identificada como indios del noreste de Argentina, de la cual no se dan más detalles sobre su identidad, localización y cultura (66), por lo cual sería conveniente considerar con reserva estos resultados. Del mismo modo se aprecia la cercanía entre las poblaciones de Brasil: Terena, Guaraní y Kaingang (67,68,69).

Los mestizos de México y Venezuela demuestran claramente que ambas poblaciones tienen una importante contribución génica proveniente de los españoles sumada al componente indígena de los pobladores originales de cada uno de estos países, y como se esperaba pertenecen a un mismo tronco filogenético. Probablemente la cercanía de los grupos indígenas de Brasil con estos nos indica que hay cierto grado de mestizaje en estas poblaciones.

Los resultados de este trabajo demuestran que la diversidad genética es restringida en los Seris, pues sólo se encontraron 7 alelos HLA-A y 11 HLA-B, hallazgo que se ha corroborado en otros grupos indígenas de América. La variabilidad genética puede parecer muy reducida, pero esto es en gran parte debido al contraste con la enorme diversidad existente en las poblaciones

urbanas, ya que éstas, al ser el resultado de la inmigración de individuos de muy diversos lugares, tienen un perfil genético que es el resultado de las contribuciones de todas las poblaciones que les dieron origen. Como en otros grupos indígenas de diversos lugares en el mundo, se ha encontrado un grado de variabilidad genética similar al que se encontró en los Seris; es probable que un número como éste de variantes similar, es el que normalmente se encuentra en grupos autóctonos, si no hay influencia de factores como la inmigración y mezcla entre distintas poblaciones.

Uno de los aspectos más importantes de este tipo de trabajos es que la caracterización genética hasta el nivel más fino, permitirá conocer el impacto de los genes sobre la epidemiología de las poblaciones, y nos proporcionará datos sobre la historia natural de las enfermedades en los grupos humanos.

## IX. CONCLUSIONES

---

1. Las técnicas de tipificación molecular de clase I presentan ventajas respecto a la serología en exactitud y precisión, con una correlación completa entre las técnicas moleculares que emplean iniciadores específicos y las que utilizan sondas específicas.
2. La técnica de PCR-SSOP tiene la ventaja sobre el PCR-ARMS de ser más económica y es más adecuada para estudios de población, y en general cuando las mezclas de amplificación se preparan manualmente se tiene un mayor control y menor susceptibilidad a desajustes por condiciones ambientales.
3. La tipificación molecular de genes clase I del MHC reviste gran importancia a distintos niveles, desde estudios de susceptibilidad a enfermedades, estudios de compatibilidad para trasplantes de médula ósea y órganos sólidos, hasta estudios de antropología molecular.
4. Los alelos HLA-A encontrados mas frecuentemente en la población seri son: \*0201, \*02, \*68, \*68/69, \*31, \*24 y \*2301. Los alelos HLA-B encontrados son: 3501, \*40, \*51, \*35, \*3505, \*5102, \*3512, \*27052, \*15, \*4801 y 44
5. Los principales haplotipos DRB-A-B son: \*0407-\*0201-\*3501 (13.6%), \*0802-\*31-\*51 (9.1%), \*0407-\*02-\*3501 (6.8%), \*0802-\*02-\*35 (6.8%), \*0407-\*68-\*3501 (4.6%), \*0407-\*31-\*5102 (4.6%), \*0802-\*02-\*40 (4.6%), \*0802-\*0201-\*40 (4.6%), \*0802-\*24-\*3501 (4.6%), \*1402-\*02-\*40 (4.6%), \*1402-\*0201-\*40 (4.6%).
6. El hallazgo del alelo B\*27052 dentro de la población seri es hasta ahora el único caso de presencia de un alelo B27 en cualquiera de los pueblos indígenas de México.

7. El grado de variabilidad de la región de clase I es notablemente mayor que para clase II, lo cual puede ser reflejo de que esta región ha estado sujeta a mayores presiones selectivas. Esto se demuestra con el análisis de clase II que mostró sólo 7 haplotipos en este grupo, pero al añadir los de clase I la diversidad de combinaciones creció a 26 haplotipos.
8. El análisis de la relación filogenética de los seris con otras poblaciones muestra que se encuentran relativamente alejados de otros grupos étnicos y que los seris se han mantenido en relativo aislamiento, conservando un perfil genético propio generado probablemente por deriva génica y mantenido por sus características endogámicas.
9. La cercanía filogenética encontrada entre seris y warao así como entre lacandones y bari, grupos étnicos de Venezuela y México, sugiere que los ambientes similares influyen en el perfil genético de la población, resultando en cercanía en la identidad genética entre poblaciones que habitan regiones semejantes más que geográficamente cercanas, lo cual apoyaría la teoría de que la diversidad genética del MHC es en parte consecuencia de las presiones que sobre éste ejercen los factores ambientales.
10. Las frecuencias genéticas de alelos en la población seri parecen reflejar el cambio gradual en el perfil genético de los pueblos conforme se avanza de Norte a Sudamérica, siguiendo la ruta migratoria de la colonización del continente.
11. Este es el primer estudio molecular de genes clase I que se lleva a cabo en un grupo mexicano.

## X. APÉNDICE

---

### 1. Reactivos

#### *Solución de lisis I*

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

#### *Solución de lisis II*

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

NONIDET (NP-40) 0.1 %

#### *SSC 20X*

NaCl 3.0 M

Citrato de sodio 0.3 M

H<sub>2</sub>O cbp. 1 L

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10 M en 800 mL de agua destilada y después aforar a un litro.

#### *Amortiguador para lisis de células blancas (WCLB)*

Tris-HCl, pH 7.6 10 mM

EDTA, pH 8.0 10 mM

NaCl 50 mM

SDS 0.2 %

Proteinasa K (sigma) 300 µg/mL

Esterilizar por filtración. Guardar la solución en alícuotas de 15 mL a -20°C

#### *Fenol saturado equilibrado*

Antes de usar el fenol debe equilibrarse a pH mayor de 7.8, porque el DNA puede quedarse dentro de la fase orgánica (fenólica) si el pH es ácido.

1. El fenol bidestilado se debe almacenar a -20°C. Cuando se prepara el fenol equilibrado se funde a 68°C (Baño maría). Al fenol líquido se adiciona 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%. La 8-

hidroxiquinolina es un antioxidante, un inhibidor parcial de RNAsa y un quelante débil de iones.

2. Añadir un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 a temperatura ambiente. Agitar con una barra magnética durante 15 min, permitir que se separen las dos fases, eliminar la fase superior (acuosa)
3. Adicionar a la fase inferior (fenólica) un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0. Agitar de igual forma que en el punto 2, remover la fase acuosa.
4. Repetir el paso 3, hasta que la fase fenólica alcance un pH mayor de 7.8 (aproximadamente pH 8.0).
5. Después de que el fenol está equilibrado, remover la fase acuosa y adicionar 0.1 volumen de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 conteniendo 0.2 % de 2-mercaptoetanol.
6. Guardar en un frasco ámbar a 4°C por periodos mayores de 1 mes.

#### *Fenol/cloroformo*

Para preparar el fenol/cloroformo debe eliminarse la fase superior del fenol saturado o tomar sólo la fase fenólica y mezclar cantidades iguales de fenol saturado y cloroformo/alcohol isoamílico. Mezclar, dejar a 4°C toda la noche. Utilizar la fase inferior.

#### *Cloroformo/alcohol isoamílico*

Tomar 24 partes de cloroformo puro y añadir una parte de alcohol isoamílico, mezclar y guardar a 4°C.

#### *NaCl 5M*

#### *Etanol 70%*

#### *TE*

Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM

#### *SEDTA*

Conservar a -20°C	
NaCl	100 mM
EDTA	50 mM
Ajustar pH 7.8 con NaOH	

#### *NaClO4 5M*

(conservar a -20°C)

#### *SDS 10%*



*EDTA 0.5 M pH 8.0*

*STE*

Tris-HCl pH 7.6	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM
NaCl	10 mM
SDS	0.5 %

*NaAc 2.5 M pH 7.9*

*TAE 50 X*

Tris-Base (Sigma)	242.0 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.25 M, pH 8.0	200.0 mL
H <sub>2</sub> O cbp.	1 L

*NaOH 0.4M*

*TE*

Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM

*SSPE 20X*

(esterilizar por autoclave)

NaCl	3.0 M
Fosfato de sodio monobásico	0.2 M
EDTA (pH 8.0)	20.0 mM
Ajustar el pH a 7.4 como en el SSC 20X y aforar.	

*Denhardt 50X*

Consultar reactivos de Southern-Blot/RFLP

*ssDNA 10 mg/mL*

Consultar reactivos de Southern-Blot/RFLP

*Solución de prehibridación (Quimioluminiscencia)*

SSPE	6 X
Denhardt	5 X
ss DNA	100 µg/mL
Lauroil Sarcosina de Sodio	0.1 %
SDS	0.02 %
H <sub>2</sub> O destilada cbp	

*SSPE 2X, SDS 0.1%*

SSPE 5X, SDS 0.1%

*Amortiguador 0*

Ácido maléico	0.1 M
NaCl	0.15 M

Esterilizar en autoclave

Puede utilizarse Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5 en lugar de ácido maléico.

Ajustar a pH 7.5 con NaOH

*Amortiguador 1*

Amortiguador 0 + Tween 20 al 0.3%

*Amortiguador 2*

Reactivo blocking (Boehringer) al 1% solubilizado en amortiguador 0.

Se recomienda preparar una solución madre al 10% en amortiguador 0, distribuir en alícuotas de 100 mL y guardarlas a -20°C hasta su uso.

La solución de trabajo se prepara diluyendo 100 mL de la solución madre a 1 L con amortiguador 0.

*Amortiguador 3*

Tris pH 9.5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM

*Anticuerpo*

Anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina

Dilución 1:10,000 en amortiguador 2

*CSPD*

Dilución 1:500 en amortiguador 3

*PBS pH 7.4*

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.0 mM

## 2. Material y equipo

Guantes  
Propipetas  
Micropipetas  
Puntas para micropipetas  
Gradillas para tubos de 15 y 50 mL  
Ligadura y jeringas de 20 mL  
Torundas  
Pipetas graduadas de 1-10 mL  
Varillas de vidrio para pescar el DNA  
Puntas para micropipetas de 1000 $\mu$ L  
Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL  
Tubos para microcentrífuga de 0.5 mL  
Tubos para centrífuga de 50 mL  
Centrífuga refrigerada  
Probetas de diferentes volúmenes  
Baño maría a 53°C  
Flotadores  
Microcentrífuga  
Congelador -20°C  
Refrigerador  
Termociclador  
Estufa de hibridación  
Cassette de exposición de placas radiográficas  
Cámara instantánea  
Transiluminador UV  
Cámara de electroforesis  
Fuente de poder para electroforesis  
Bomba de vacío  
Aparato de doteo manual  
Espectrofotómetro para cuantificación de oligos

## XI. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1 AK Abbas, AH Lichtman, JS Pober. Cellular and Molecular Immunology 2<sup>nd</sup> ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1994. p. 96-114.
- 2 GD Snell, J Dausset, S Nathenson. Histocompatibility. Academic press. Nueva York. 1976. 1-9, 181-185, 228-233.
- 3 E Albert, D Götze. The Major Histocompatibility System in Man. En: The Major Histocompatibility System in Man and Animals. Ed: D Götze. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Nueva York. 1977. 7-77.
- 4 J Trowsdale, J Ragoussis, RD Campbell. Map of the human MHC. Immunology Today. 1993: 14: 349-352
- 5 P Parham. Evolution of class I HLA polymorphism: selection and drift. En: HLA 1991. Ed K Tsuji M Aizawa T Sasazuki. Oxford University Press. Nueva York 1992. vol 1. 72-81.
- 6 J Trowsdale. Organization of the human MHC. En HLA and Disease, the Molecular Basis. Eds: A Svejgaard, S Buus, L Fugger. Munksgaard. Dinamarca 1997. p. 21-37.
- 7 DE Carosella, J Dausset, M Kirszenbaum. HLA-G revisited. Immunology Today 1996: 17. 9. 407-409.
- 8 F Momburg, JJ Neefjes, GL Hämmerling. Peptide Selection by MHC-encoded TAP transporters. Current Opinion in Immunology 1994: 6: 32-37.
- 9 J Trowsdale, RD Campbell. The 12<sup>th</sup> International MHC map. En: HLA. Ed: D Charron. EDK. París, Francia. 1997. I: 499-504.
- 10 IA York, KL Rock. Antigen Processing and Presentation by the class I Major Histocompatibility complex. Annu. Rev. Immunol. 1996. 14: 369-96.
- 11 R Sayle, E Milner-White. RasMol: Biomolecular graphics for all. Trends in Biochemical Sciences (TIBS), 1995, 20: 9: 374.
- 12 A So. Structure and assembly of class I and class II molecules En: HLA and Disease. Ed: R Lechler. Academic Press. Londres. 1994. 35-47.
- 13 JL Strominger, DC Wiley. The class I and class II proteins of the human major histocompatibility complex. En HLA and Disease, the Molecular Basis Eds: A Svejgaard, S Buus, L Fugger. Munksgaard. Dinamarca 1997. p. 38-45.

- 
- 14 R Lechler. The roles of class I and II molecules of the major histocompatibility complex in T-cell immunity. En: HLA and Disease. Ed: R Lechler. Academic Press. Londres. 1994. 35-47.
  - 15 IA Wilson, KC Garcia, M Degano, RL Stanfield, Z Zeng, B Segelke, EA Stura, AR Castano, DA Jewwell, A Brunmark, MR Jackson, PA Peterson, L Teyton. Structural basis of cellular immune recognition. En HLA and Disease, the Molecular Basis. Eds: A Svejgaard, S Buus, L Fugger. Munksgaard. Dinamarca 1997. p. 46-60.
  - 16 A So. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. En: HLA and Disease. Ed: R Lechler. Academic Press. Londres. 1994. 1-34.
  - 17 JJ Monaco, D Nandi, K Marusina, M Iyer, H Jiang. Function and polymorphism of MHC genes in class I antigen processing. En HLA and Disease, the Molecular Basis. Eds: A Svejgaard, S Buus, L Fugger. Munksgaard. Dinamarca 1997. p. 91-99.
  - 18 FM Brodsky, L Lem, PA Bresnahan. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 1996; 47: 464-471.
  - 19 M Ishihara, S Ohno, N Mizuki, N Yamagata, T Ishida, T Naruse, A Ando, H Inoko. LMP7 Polimorphism in Japanese Patients With Sarcoidosis and Behçet's Disease. *Human Immunology* 1996, 51: 103-105.
  - 20 SJ Powis, EV Deverson, WJ Coadwell, A Ciruela, NS Huskisson, H Smith, GW Buther, JC Howard. Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule. *Nature*, 1992, 357: 211-215
  - 21 T Elliott. How does TAP associate with MHC class I molecules? *Immunology Today*. 1997: 18: 8: 375-379.
  - 22 M Svensson, BStockinger, MJ Wick. Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Can Process Bacteria for MHC-I and MHC-II Presentation to T Cells. *The Journal of Immunology*. 1997: 4229-4236.
  - 23 SHE Kaufmann. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunology Today*. 1995: 16: 7: 338-342.
  - 24 KL Rock. A new foreign policy. MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunology Today* 1996: 17: 131-137
  - 25 J Reimann, SHE Kauffmann. Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Current Opinion in Immunology* 1997, 9: 462-469.
  - 26 JG Bodmer et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* 1995: 46: 1-18.
  - 27 JG Bodmer et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* 1997: 49: 297-321.
  - 28 C Lopez-Larrea, S Gonzalez-Roces, M Peña, O Domínguez, E Coto, V Alvarez, M Moreno, O Hernandez, R Burgos-Vargas, C Gorodezky. Characterization of B27 Haplotypes by Oligotyping and Genomic Sequencing in the Mexican Mestizo Population with Ankylosing Spondylitis: Juvenile and Adult Onset. *Human Immunology* 1995: 43: 174-180.

- 
- 29 ML Satz, M Fernández-Viña, GC Theiler, YC Marcs, Nlindel, M Capucchio, C Gorodezky, L Fainboim, P Stastny. Allelicheterogeneity of HLA-B35subtypes in different populations as assessed by DNA typing. *Tissue Antigens* 1995; 46: 196-203.
  - 30 P Parham T Ohta. Population Biology of Antigen Presentation by MHC Class I Molecules. *Science* 1996. 272: 67-74.
  - 31 C Gorodezky et al. Ethnic report on native Americans in South America and Mexico. En *HLA* 1991. Ed K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki. Oxford University Press. Nueva York 1992. 685-688.
  - 32 FM Salzano, SM Callegari-Jacques. South American Indians. A case study in evolution. Oxford University Press, Nueva York 1988.
  - 33 C Gorodezky. Genetic Difference between Europeans and Indians: Tissue and Blood Types. *Allergy Proc.* 1992: 13: 5: 243-250.
  - 34 M Browning, P Krausa. Genetic diversity of HLA-A2: evolutionary and functional significance. *Immunology Today*. 1996: 17: 4: 165-170.
  - 35 A McMichael. HLA in Infectious disease. En *HLA and Disease, the Molecular Basis*. Eds: A Svejgaard, S Buus, L Fugger. Munksgaard. Dinamarca 1997. p. 317-331.
  - 36 W Bodmer. HLA Polymorphism: Origin and Maintenance. En: *HLA* 1997. Eds. Terasaky y Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles California 1997 1-6.
  - 37 TH Iha, G Gerbrandt, WF Bodmer, D McGary, WH Stone. Cross-reactions of cattle lymphocytotoxic sera with HLA and other human antigens. *Tissue Antigens* 1993: 3: 291-302.
  - 38 A Olivo, H Debaz, G de la Rosa, M Moreno, V Juárez, C Gorodezky, Y Guedez, E Domínguez, F Herrera, M Soto, M Matos, J Scorza, Z layrisse. Alelos y Haplotipos del Complejo principal de Histocompatibilidad en Tres Poblaciones Indígenas Americanas, Estudios serológicos y moleculares realizados en México y Venezuela. En *Polimorfismo Génico (HLA) en Poblaciones Hispanoamericanas*. ED: AM Municio, PG Barreno. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Madrid, 1996. 195-214.
  - 39 FL Black. Why they die? *Science* 1992: 258: 1739-1740.
  - 40 LF Cadavid, DI Watkins. Heirs of the jaguar and the anaconda: HLA, conquest and disease in the indigenous population of the Americas. *Tissue Antigens* 1997: 50: 209-218
  - 41 P Parham, KL Arnett, EJ Adams, AM Little, K Tess, LD Barber, SGE Marsh, T Ohta, T Markow, ML Petzl-Erler. Episodic evolution and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americas. *Tissue Antigens* 1997: 50: 219-232.
  - 42 CY Marcos, MA Fernández-Vina, AM Lázaro, CJ Nulf, EH Raimondi, P Stastny. Novel HLA-B35 Subtypes. Putative Gene Conversion Events with Donor Sequences from Alleles Common in Native Americans (HLA-B\*4002 or B\*4801). *Human Immunology* 53, 148-155 (1997).

- 
- 43 G Vargas-Alarcon, J Martínez-Laso, E Gomez-Casado, J Granados, N Díaz- Campos, P Varela, M Alvarez, A Arnaiz-Villena. A novel HLA-B35 (B\*3517) allele found in a Mexican of Otomi descent. *Tissue Antigens* 1996: 47: 547-550.
  - 44 WH Hildebrand, JA Madrigal, MP Belich y col. Serologic crossreactivities poorly reflect allelic relationships in the HLA-B12 and HLA B-21 groups: Dominant epitopes of the alpha 2 helix. *J Immunol* 1992: 149: 3563-3568.
  - 45 MA Fernandez-Viña, AM Lázaro, CY Marcos, C Nulf, E Raimondi, EJ Haas, P Stasny. Dissimilar evolution of B-locus versus A-locus and class II loci of the HLA region in South American Indian tribes. *Tissue Antigens* 1997: 50: 233-250.
  - 46 BE Terrazas, ML Pérez. *Pueblos Indígenas de México. Seris. Instituto Nacional Indigenista. México DF. 1993.*
  - 47 E Infante, A Olivo, C Aláez, MN Vázquez, J Pujol, C Durán, JL Navarro, C Gorodezky. HLA class I typing in Seri Indians. *Visuals of the 12<sup>th</sup> Clinical Histocompatibility Workshop*, Ed: P Terasaki, One Lambda, 1997
  - 48 KB Mullis et al. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986 51: 263-273.
  - 49 RK Saiki. The Design and Optimization of the PCR. En: *PCR Technology*. Ed: HA Erlich. Stockton Press. Nueva York. 1989. 7-16.
  - 50 D Middleton, F Williams. *A History of DNA Typing for HLA en HLA 1997*. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p.61-84.
  - 51 O Olerup, et al. HLA-DQB1 and -DQA1 typing dy PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993:41:119-134.
  - 52 M Brunce, CM O'Neill, MCNM Barnardo, P Krausa, MJ Browning, PJ Morris, KI Welsh. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995: 46: 355-367.
  - 53 EPH Yap, JO McGee. Detection of Mutations by PCR. En: *PCR Technology: current innovations*. Ed. HG Griffin AM Griffin. CRC Press. Nueva York 1994. 110-111.
  - 54 S Kwok et al. Design and Use of Mismatched and Degenerate primers. En: *PCR primer: Laboratory manual*. Ed. CW Dieffenbach GS Dveksler. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York 1995. 143-147.
  - 55 C Neviny-Stickel, et al. Non-radioactive HLA class II typing using polymerase chain reaction, digoxigenin-labelled oligonucleotides, and chemiluminiscent detection. En *HLA 1991*. Ed. K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki. Oxford University Press. Nueva York 1992. 302-304.
  - 56 GE Rodey. *HLA beyond tears*. De Novo Inc. Atlanta. 1991. 85-94.
  - 57 MV Bozón et al. Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing. *Tissue Antigens* 1996: 47: 512-518.

- 
- 58 J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis. *Molecular Cloning: a laboratory manual* 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York 1989. Appendix E.
- 59 F Williams et al. Development of PCR-SSOP for the identification of HLA-A\*02 subtypes and determination of HLA-A\*02 frequencies within different ethnic populations. *Tissue antigens* 1997. 42: 2: 129-133.
- 60 J Bodmer, S Marsh. Class I SSP ARMS-PCR typing. En: *HLA* 1996. Ed.D Charon. EDK. Paris Francia 1997.
- 61 AA Zachary. *Statistical Analyses of Genetic Data*. *Ashi Quarterly*, Winter 1995: 4-7.
- 62 J Lee. Chinese Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 267-268.
- 63 T Fukunishi, M Hashimoto. Japanese Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 269-270.
- 64 B Graugaard, L Bonde, N Grunnet. Inuits/Eskimos Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. *UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997*. p. 302.
- 65 AM Lázaro, MA Fernandez-Viña, E Raimondi, CY Marcos, P Stastny. Two South American Indian Tribes Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 285-286.
- 66 I Balazs. Northwestern Argentine Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 287-289.
- 67 ME Moraes, JR Moraes. Terena Indians Brazilian Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 290.
- 68 ML Petz-Erler. Guarani Amerindian Brazil Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 291.
- 69 ML Petz-Erler. Kaingang Amerindian Brazil Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 292.
- 70 A Olivo, C Aláez, H Debaz, M Moreno, M Vázquez, G de la Rosa, C Gorodezky. Mexican Lacandon Indians of Mayan Ancestry Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 293-294.
- 71 A Olivo, C Aláez, H Debaz, M Vazquez, G de la Rosa E Perez-Luque, A Hernandez, C Gorodezky. Mexican Mestizo Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 295-296.
- 72 E Infante, C Aláez, A Olivo, F Williams, D Middleton, H-Debaz, MN Vázquez, MJ Pujol, C Duran, JL Navarro, C Gorodezky. Mexican Seri Indians from the state of Sonora Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p.297-298.
- 73 Z Layrisse, Y Guedez, E Dominguez, S Montagnani, M Matos, F Herrera, J Scorza. Bari Venezuelan Normal. En: *HLA* 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 299.



- 
- 74 NJ Makhatadze, Z Layrisse, E Dominguez, MT Franco, F Herrera. Mestizo Venezuelan Normal. En: HLA 1997. Ed: Terasaki, Gjertson. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, California, 1997. p. 300-301.
  - 75 Z Layrisse, HD Heinen, O Balbas, E Garcia, Z Stoikow. Unique HLA-DR/DQ Associations Revealed by Family Studies in Warao Amerindians. Haplotype and Homozygosity Frequencies. Human Immunology 1988: 23: 45-57.
  - 76 LL Cavalli-Sforza, WF Bodmer. Human Evolution. En: The genetics of human populations. Ed: WH Freeman. San Francisco CA, USA, 683-752.
  - 77 N Saitou, M Nei. The Neighbor -joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol Biol. Evol. 1987: 19: 153-170.
  - 78 E Martinez-Naves, LD Barber, JA Madrigal, CM Vullo, C Clayberger, SC Lyu, RC Williams, C Gorodezky, T Markow, ML Petz-Erler, P Parham. Interactions of HLA-B\*4801 with peptide and CD8. Tissue Antigens 1997: 50: 258-264.
  - 79 MP Belich, JA Madrigal, WH Hildebrand, J Zemmour, RC Williams, R Luz, ML Petz-Erler, P Parham. Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. Nature 1992: 357: 326-332.
  - 80 ML Petzl-Erler, C Gorodezky, Z Layrisse, W Klitz, L Fainboim, C Vullo, JG Bodmer, E Egea, C Navarrete y col. Anthropology report for Region Latin-America: Amerindian and admixed populations. En: HLA. Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication. Ed: D Charron. EDK Paris 1997. p. 337-345.