



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**HAPLOTIPOS DEL HLA CLASE I Y CLASE II DE FAMILIAS MESTIZAS DE
DIVERSAS REGIONES DE MÉXICO**

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

RAQUEL FABIOLA HERNÁNDEZ DÍAZ



MÉXICO, D.F.

2009



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dra. Alicia Beatriz Cervantes Peredo

VOCAL: Profesor: Dr. Fernando García Tamayo

SECRETARIO: Profesor: Dr. Julio Granados Arriola

1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. Jorge Fernando Solís Paniagua

2° SUPLENTE: Profesor: Dr. León Patricio Martínez Castilla

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: ESCUELA NACIONAL DE ANTROPOLOGÍA E HISTORIA

ASESOR DEL TEMA: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (si lo hay):

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (s): RAQUEL FABIOLA HERNÁNDEZ DÍAZ

(nombre (s) y firma (s))

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A mi asesor el Dr. Julio Granados por su apoyo, tiempo y principalmente por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A Víctor por su instrucción y asesoría desde mi entrada a la ENAH hasta ahora.

A mis papás, porque no creo que pueda existir mayor apoyo que el que me han dado: me han puesto en el camino y me han hecho quien soy.

Gracias a ustedes, los planes y sueños que tengo han ido tomando forma a lo largo de estos años.

A mi hermana For, porque pase lo que pase y sin importar el lugar en que nos encontremos, eres mi cenzeliztli: te traigo tan dentro de mí, como a mi hígado.

A Mónica y Rodrigo (la Iguana y el Rock) mis hermanos del alma. Me ha dejado tanto conocerlos, he aprendido y vivido tantas cosas a su lado, que enriquecen mi vida. Sé que juntos nos hacemos mejores personas.

Rodrigo, sin tí esto no hubiera sido posible, gracias totales.

A Tania, por compartir y ser parte de la nada fácil transición de una etapa de mi vida - en muchos aspectos- y por los planes y retos que ahora vienen y que me dibujan una sonrisa.

A todos y cada uno de mis amigos, maestros, familiares y compañeros, que compartieron este espacio-tiempo conmigo y que colorearon mi existencia.

Por lo que fue, es y será, gracias.

Índice

1. Introducción	5
2. Protocolo experimental	15
2.1 Objetivos	15
2.2 Material y métodos	15
2.2.1 <i>Las familias</i>	15
2.2.2 <i>Extracción de DNA de sangre total periférica</i>	16
2.2.3 <i>Tipificación y amplificación del HLA</i>	16
2.2.4 <i>Electroforesis</i>	17
2.2.5 <i>Análisis estadístico</i>	17
2.3 Resultados	19
2.4 Discusión	28
2.5 Conclusiones	31
3. Revisión bibliográfica	32
4. Anexos	34
Anexo I material, reactivos y equipo	34
Anexo II metodologías	36
Anexo III preparación de reactivos	38
Anexo IV interpretación de los geles	40
5. Artículo	

1. Introducción

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es una región genética presente en casi todos los vertebrados. Para el caso del humano, estos genes son llamados genes del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y, entre otras funciones, codifican para proteínas presentadores de antígenos, siendo fundamental su estudio y entendimiento como parte de muchas enfermedades tanto infecciosas como autoinmunes.

La tarea de presentar antígenos asociados a células para que sean reconocidos por los linfocitos T corre a cargo de proteínas que son codificadas por los genes del MHC, esto es, su función fisiológica es la presentación de péptidos a los linfocitos T y la función de éstos, a su vez, consiste en destruir o coordinar la destrucción de las células infectadas con microorganismos patógenos y/o células que no estén funcionando correctamente (como células cancerosas).

Este sistema genético es el más polimórfico en el ser humano y aunque sus alelos se encuentran distribuidos globalmente existen contrastes entre algunas frecuencias alélicas y haplotípicas que permiten utilizarlo para estudios poblacionales.

- *Estructura de las moléculas del MHC y procesamiento de antígenos*

Existen dos tipos de productos génicos del MHC, denominadas moléculas del MHC clase I y clase II, que contactan con diferentes conjuntos de antígenos proteicos; antígenos citosólicos (intracelulares) y antígenos extracelulares que han sido endocitados, respectivamente.

Las moléculas de clase I presentan péptidos a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y las de clase II a los linfocitos T cooperadores CD4⁺.

Las moléculas de clase I constan de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente: una cadena α codificada por el MHC de 44 a 47 kD y una subunidad de 12 kD denominada β_2 microglobulina que no es codificada por los genes del MHC.

Cada cadena alfa está orientada de manera que tres cuartas partes del polipéptido completo se extienden dentro del medio extracelular, un breve segmento hidrófobo cruza la membrana celular y los residuos carboxílicos terminales se localizan en el citoplasma. Los segmentos amino terminal (N-terminal) α_1 y α_2 de la cadena alfa, cada uno con una longitud de 90 residuos aproximadamente, interactúan para formar una plataforma que forma la hendidura de unión a péptidos de las moléculas de clase I. El tamaño que tiene es suficientemente grande para fijarse a péptidos de 8 a 11 aminoácidos con una conformación extendida y flexible. Los extremos de las hendiduras de unión a péptidos de clase I están cerrados, de forma que los péptidos grandes no pueden unirse. Por lo tanto las proteínas tienen que ser procesadas para generar fragmentos que sean lo suficientemente pequeños para unirse a las moléculas del MHC y para ser reconocidas por los linfocitos T.

Imagen 1: Estructura del MHC clase I

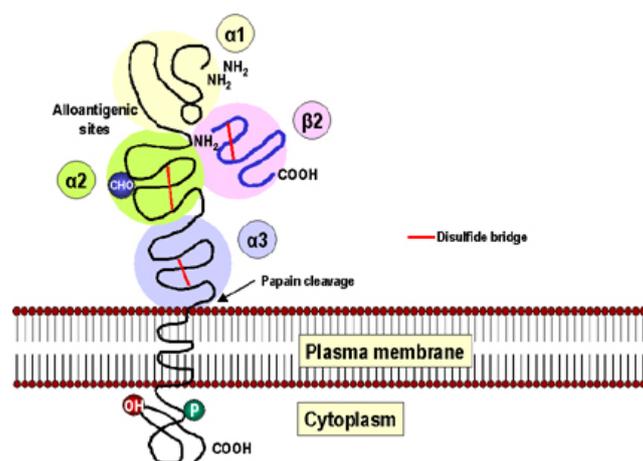


Imagen tomada de MHC_expression.svg

Los péptidos asociados al MHC de clase I se producen por la degradación proteolítica de proteínas citosólicas, el transporte de los péptidos generados hacia el retículo endoplásmico (RE) y la unión a las moléculas de clase I recién sintetizadas.

1. Producción de proteínas en el citosol

Los antígenos extraños del citosol pueden ser productos de virus o de otros microbios intracelulares que infectan a las células y sintetizan sus propias proteínas durante su ciclo vital. En el caso de células tumorales, los propios genes mutados o los oncogenes producen a menudo antígenos protéicos que son reconocidos por los receptores de los linfocitos T (TCR).

2. Degradación proteolítica de las proteínas citosólicas

El proteosoma es un gran complejo enzimático con un amplio espectro de actividades proteolíticas, esto es, degrada muchas proteínas citoplasmáticas diferentes. Dichas proteínas se marcan para su degradación mediante la unión covalente a un pequeño polipéptido llamado ubiquitina. Después de la ubiquitinización, las proteínas se despliegan, y entran al proteosoma, produciendo los péptidos que se unirán a las moléculas de clase I.

3. Transporte de los péptidos desde el citoplasma al RE

Los péptidos antigénicos generados en el citosol son trasladados al RE, lugar donde son sintetizadas las moléculas del MHC clase I, en donde pasan a través transportadores especializados (transportador asociado al procesamiento antigénico o TAP) unidos covalentemente a las moléculas de clase I mediante la tapasina.

4. Ensamble de los complejos péptido-MHC clase I en el RE

Los péptidos trasladados hacia el RE se fijan a las moléculas de clase I, este complejo se libera de la tapasina y sale del RE hacia la superficie celular.

5. Expresión en la superficie de los complejos péptido-MHC clase I

Los complejos péptido-MHC clase I se mueven a través del aparato de Golgi y se transportan hacia la superficie celular mediante vesículas. Una vez en la superficie celular, estos complejos pueden ser reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos peptídicos.

Las moléculas del MHC clase II son glicoproteínas unidas a membrana, con dominios extracelulares, segmento transmembranal y cola citoplásmica (carboxi terminal).

Cada molécula de clase II está formada por dos cadenas asociadas entre sí de forma no covalente: una cadena α de 32 a 34 kD y una cadena β de 29 a 32 kD.

Los segmentos amino terminales $\alpha 1$ y $\beta 1$ de las cadenas de clase II interactúan para formar la hendidura de unión a péptidos.

Los péptidos que se albergan en el surco de MHC-II son más largos que los de la clase I: de 13 a 20 aminoácidos. Esto parece que se debe al hecho de que la hendidura de MHC-II no está tan cerrada por sus extremos. Los péptidos no tienen por qué encajar entre los límites de esta hendidura, sino que pueden sobresalir de ellos.

Al igual que en MHC-I, las moléculas de clase II pueden unirse a un juego amplio pero finito de péptidos, de modo que cada variante alélica tiene una gama de péptidos a los que se enlaza.

Imagen 2: Estructura del MHC clase II

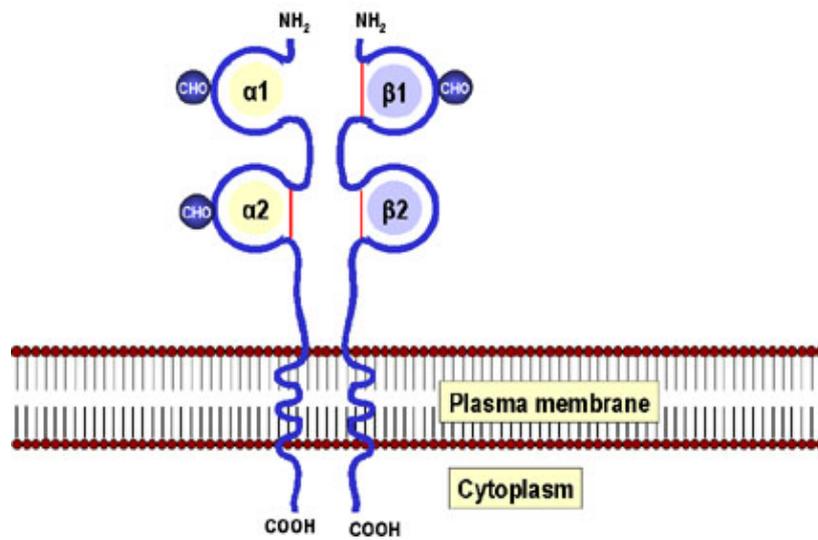


Imagen tomada de MHC_expression.svg

La generación de péptidos asociados a las moléculas del MHC clase II a partir de antígenos endocitados supone la degradación proteolítica de proteínas internalizadas en vesículas y la unión de los péptidos a las moléculas de clase II.

1. Captación de los antígenos extracelulares en los compartimentos vesiculares de las células presentadoras de antígenos (CPA).

Diferentes CPA pueden unirse a antígenos protéicos de distintas maneras y con diferentes especificidades y eficiencias.

Los macrófagos y las células dendríticas expresan distintos receptores de superficie que reconocen estructuras compartidas con muchos microorganismos.

Algunas CPA también expresan receptores para la porción Fc de los anticuerpos y para la proteína C3b del complemento, así como también los receptores para inmunoglobulinas de superficie de los linfocitos B, potencializando la internalización de los microorganismos.

Los microorganismos internalizados se particulan en vesículas llamadas fagosomas, que, unidas con los lisosomas se denominan fagolisosomas.

2. Procesamiento de las proteínas internalizadas

Las proteínas internalizadas se degradan enzimáticamente en los fagolisosomas en un proceso activo mediado por proteasas que tienen valores ácidos de pH.

3. Biosíntesis y transporte de las moléculas del MHC clase II a los fagolisosomas

Las moléculas del MHC clase II son sintetizadas en el RE, y se transportan a los fagolisosomas mediante una proteína asociada llamada cadena invariable I_i, la cual ocupa los sitios de unión de las moléculas de clase II recién sintetizadas. Además su plegamiento y ensamblaje es facilitado por proteínas chaperonas como la calnexina.

4. Asociación de los péptidos procesados a las moléculas del MHC clase II en vesículas

Se han identificado vesículas o endosomas que desempeñan una función importante en la presentación antigénica, las cuales se denominan compartimentos del MHC clase II o CCII. Estas vesículas poseen todos los componentes necesarios para la asociación peptídica de clase II.

Una vez dentro de las CCII se elimina la I_i por la acción de enzimas proteolíticas y a continuación, los péptidos antigénicos pueden unirse a los lugares de fijación peptídica disponibles en las moléculas de clase II.

5. Expresión de los complejos péptido- molécula clase II en la superficie de las CPAs.

Las moléculas de MHC clase II se estabilizan por la acción de unos péptidos unidos, cuya función es que solo los complejos MHC clase II- péptido adecuadamente cargados lleguen hasta la superficie de las CPA.

Los complejos estables MHC clase II-péptido se reparten en la superficie de la CPA en donde se presentan para su reconocimiento por los linfocitos T CD4⁺

Imagen 3: Procesamiento de antígenos proteicos para la presentación asociada al MHC de clase I y clase II

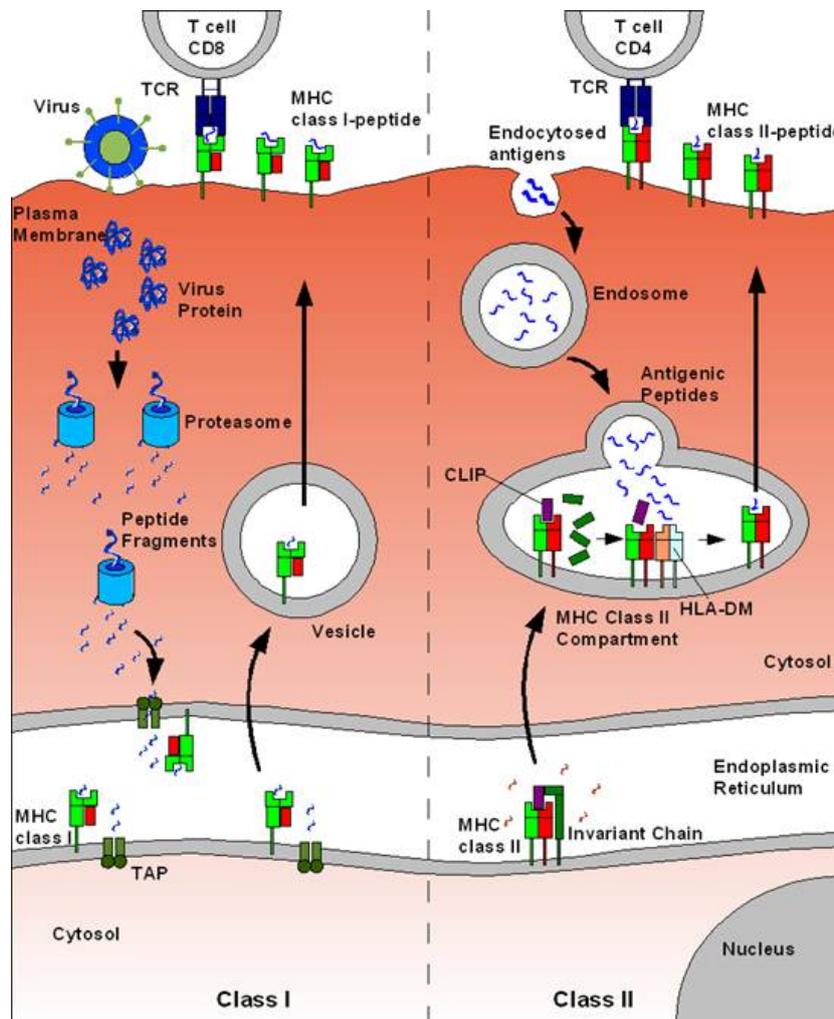


Imagen tomada de igrid-ext.cryst.bbk.ac.uk/image006.jpg

o *Ubicación genética*

En los seres humanos, el MHC se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3). Ocupa un largo segmento de DNA extendiéndose unas 3,500 kilobases (kb). En otras palabras, se extiende unos 4 centimorgans (cM) lo que quiere decir que en cada meiosis se produce un entrecruzamiento en el MHC con una frecuencia aproximada del 4%.

Los genes de clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C se encuentran en la porción más telomérica del *locus* del HLA, mientras que los de clase II son los más centroméricos del *locus* del HLA.

Imagen 4: mapa genético del MHC humano

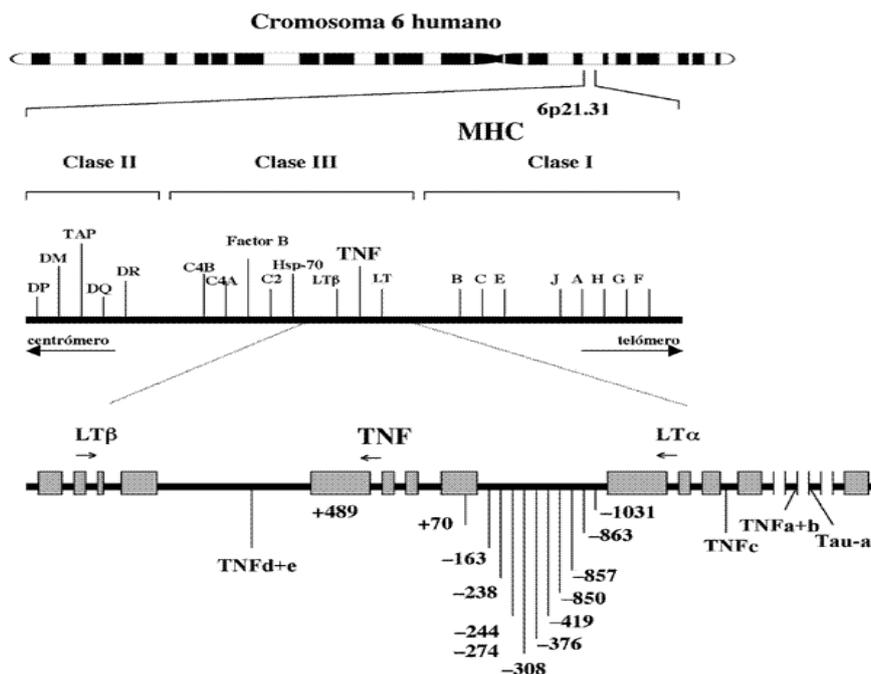


Imagen tomada de www.scielo.cl/fbpe/img/rmc/v130n9/F22.gif

o *Propiedades de los genes del MHC*

1. Los dos tipos de genes del MHC (clase I y clase II), codifican dos grupos de proteínas estructuralmente distintas pero homólogas.

Además existe otra región genética denominada MHC clase III, ubicada entre los genes de clase I y clase II, los cuales codifican diversos componentes del sistema del complemento, algunas citocinas relacionadas con el proceso inflamatorio (como la linfotóxina β y el factor de necrosis tumoral TNF) así como proteínas del choque térmico.

2. Los genes del MHC son los más polimorfos del genoma. Sin embargo, estos polimorfismos no están distribuidos uniformemente por todo el MHC. Dentro de una determinada molécula de clase I o clase II, el polimorfismo estructural se agrupa en determinadas regiones de la molécula.
3. Los genes del MHC se expresan de forma codominante, esto es, cada individuo hereda un juego de MHC del padre y otro juego de la madre, cada uno con sus distintos alelos. Cada juego completo de alelos heredado de un progenitor se denomina haplotipo.

Imagen 6: expresión codominante de las moléculas del MHC

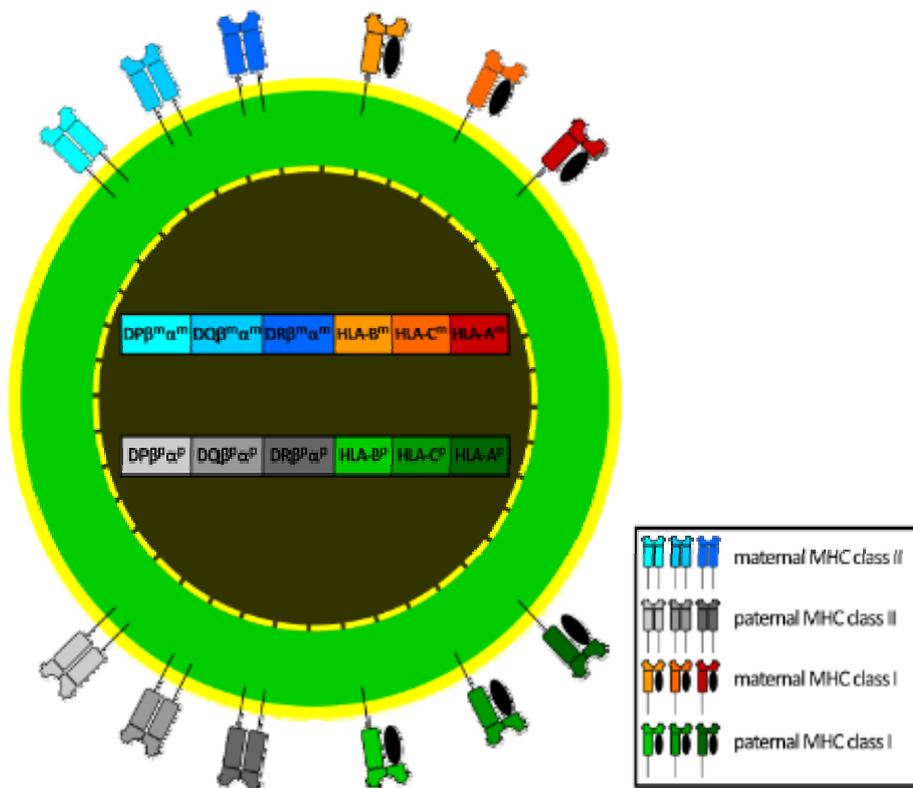


Imagen tomada de igrid-ext.cryst.bbk.ac.uk/.../image006.jpg

- *Importancia del estudio del sistema genético del MHC*

El alto grado de polimorfismo hace que el análisis de la variación de este sistema sea de gran utilidad en estudios de genética de poblaciones. Por otra parte, es un sistema con una fuerte tendencia al desequilibrio genético (LD), por lo que sus genes se heredan en bloque en una frecuencia muy alta (esto aunado al alto grado de polimorfismo, produce una gran especificidad).

Los alelos y haplotipos del sistema HLA son buenos marcadores para estudiar las relaciones genéticas entre las poblaciones.

A través de los análisis de ligamiento y los estudios de asociación, numerosos haplotipos del MHC han sido asociados con la susceptibilidad y protección a diversas enfermedades, así como a fenómenos de adaptación. Estas enfermedades incluyen desde procesos infecciosos (HLA-B*5301 confiere protección contra la malaria), desórdenes autoinmunes (HLA-DRB1*1501 confiere susceptibilidad a la esclerosis múltiple,) hasta desórdenes metabólicos como la diabetes mellitus y la aterosclerosis.

Así mismo, el estudio de los polimorfismos del HLA complementa el conocimiento de las frecuencias haplotípicas útiles en la creación de programas de donadores voluntarios y de bancos de células de cordón, facilitando la identificación de donadores potenciales de células y órganos, permitiendo de esta manera mejorar las políticas de salud.

2. Protocolo experimental

2.1 Objetivos

- El objetivo del estudio es describir la frecuencia de los haplotipos que se obtuvieron mediante el análisis de familias mexicanas provenientes de 3 poblaciones mestizas de México (Ciudad de México, Puebla y Sinaloa) así como estudiar el mestizaje génico y estimar el componente ancestral amerindio, europeo y africano.
- Comparar la frecuencia de alelos y haplotipos de mestizos mexicanos con respecto a los previamente reportados en otros grupos étnicos.

2.2 Material y métodos

2.2.1 Las familias

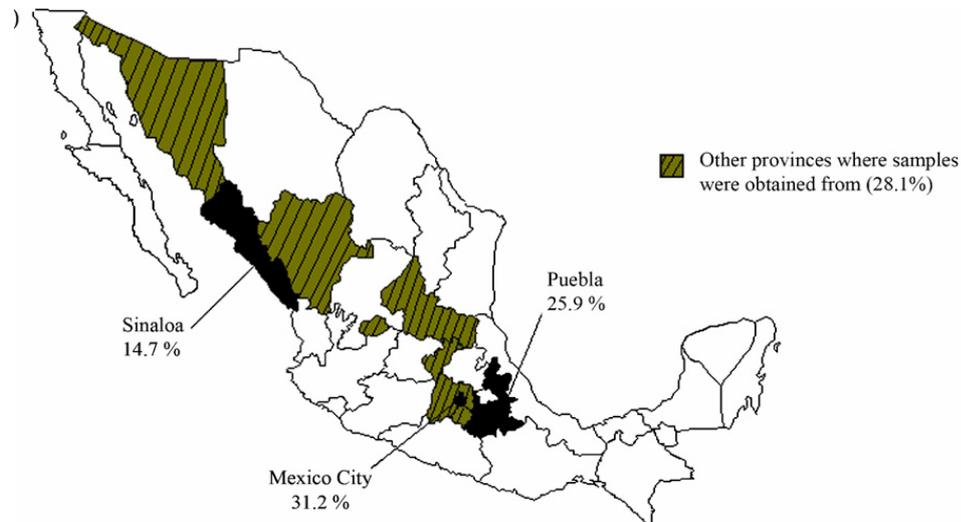
El estudio incluyó 191 familias mexicanas (381 individuos no relacionados: 80 esposos y 80 esposas, más un haplotipo inferido). Los hijos se usaron solo para describir cabalmente la segregación de alelos y haplotipos dentro de una familia, de tal manera que solos los esposos se contaran para el cálculo de frecuencias génicas y haplotípicas.

Los individuos provienen de distintas regiones de México, principalmente del norte y del centro del país, consideradas regiones de mucha diversidad étnica.

Las pruebas fueron desarrolladas para emparejar donadores y receptores tanto de médula ósea como de órganos.

Ninguno, ni los receptores, los donadores o los familiares fueron sabidos de padecer enfermedades autoinmunes.

Imagen 6: mapa de México y el origen de las familias.



2.2.2 Extracción de DNA genómico a partir de sangre total periférica (maxim biotech bd tract)

Se llevó a cabo por salting-out, metodología basada en la densidad y solubilidad del DNA para su purificación.

2.2.3 Tipificación del HLA

Todos los individuos fueron tipificados para HLA clase I (HLA-A y HLA-B) y HLA clase II (HLA-DRB1 y HLA-DQB1) por procedimiento de PCR-SSP.

En la PCR-SSP (*Polimerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*; Reacción en Cadena de la Polimerasa – Primer Específico de Secuencia), los alelos del individuo son amplificados por iniciadores (primers) que corresponden específicamente a esa región. Esta metodología incluye una mezcla de iniciadores específicos de secuencia, en este caso en particular, los distintos alelos de las clases I y II del HLA en los *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-DR y HLA-DQ, además de un control positivo.

2.2.4 Electroforesis

La electroforesis es un método en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

La electroforesis en agarosa permite separar moléculas de DNA cuando éstas son sometidas a un campo eléctrico y atraídas hacia el polo opuesto a su carga neta.

En los ácidos nucleicos la dirección de migración es del electrodo negativo al positivo debido a la carga negativa presente en el esqueleto [azúcar-fosfato](#) de los ácidos nucleicos.

El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante que cuando se expone a la luz ultravioleta emite una luz roja-anaranjada intensificándose unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN.

2.2.5 Análisis estadístico

Los alelos del HLA y las frecuencias haplotípicas fueron obtenidos por conteo génico directo.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) y el desequilibrio de ligamiento (LD) fueron calculados con el software Arlequin versión 2.0.

Las estimaciones de ancestría fueron calculadas mediante la tipificación del HLA-B de las muestras usando un modelo trihíbrido de mestizaje con el método de máxima verosimilitud con el software Leadmix 1.0 (Likelihood Estimation of ADMIXture).

El modelo se basa en calcular la contribución de alelos de cada población nativa que dieron origen a la población mestiza y que están presentes en ella. Existen diferentes métodos matemáticos, y aunque en esencia todos los que se usan actualmente son válidos, puede haber diferencias en los cálculos obtenidos por un método o por otro. Los resultados que se obtienen son estimaciones que poseen un cierto rango de error.

El método usado fue elegido ya que es el que más se adapta a las condiciones de nuestro estudio y contiene parámetros que podemos modificar: el tiempo en

que se produjo el mestizaje, si ha habido cambios de la población mestiza hasta ahora; la diferencia entre las poblaciones nativas antes de mezclarse, así como el tamaño de las poblaciones involucradas.

Las frecuencias del HLA-B de las siguientes poblaciones de referencia fueron utilizadas para el análisis de ancestría: europeos (Murcianos; Muro et al., 2001), amerindios (Nahuas; Vargas-Alarcón et al., 2006) y africanos (Hammond et al., 1997).

Imagen 7: modelo de mestizaje para calcular ancestría

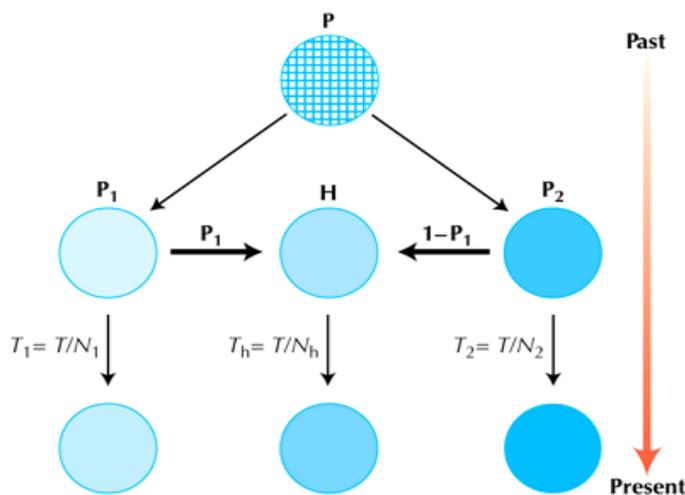


Imagen tomada de evolution-textbook.org/22_EVOW_CH25.jpg

En el modelo se considera que al menos dos poblaciones ancestrales independientes P_1 y P_2 (diferenciadas a partir de una población ancestro común P_0 como consecuencia de un periodo de aislamiento y divergencia T_0), con un tamaño N_1 y N_2 , intercambian genes durante un periodo determinado T_m en ciertas proporciones p_1 y p_2 , creando una población híbrida H de tamaño N_h . Durante el mestizaje, las distribuciones de frecuencia de P_1 y P_2 son los vectores x_1 y x_2 , y el de la población híbrida es $p_1x_1 + p_2x_2$. Tras el mestizaje, P_1 , P_2 y H evolucionan de manera independiente (sin migración) por deriva génica (sin mutaciones) hasta el presente.

Adicionalmente las proporciones de los haplotipos específicos para amerindios, europeos, africanos, asiáticos y mexicanos en nuestra muestra fueron calculados basándonos en las frecuencias de haplotipos étnico específicos del HLA-A/ -B/ -DRB1/-DQB1.

2.2 Resultados

No se detectaron desviaciones significativas en la distribución de los alelos del HLA al momento de calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg.

En este estudio fueron encontrados 19 alelos HLA-A, 43 alelos HLA-B, 14 alelos HLA-DRB1 y 7 alelos HLA-DQB1.

Los alelos del HLA-A más frecuentes fueron HLA –A*02,-A*24, y –A*68, y los alelos HLA-B más frecuentes fueron HLA-B*35, -B*39 y –B*51.

Los alelos de clase II más frecuentes fueron HLA-DRB1*04, -DRB1*08, -DRB1*07, -DQB1*0302, -DQB1*0301, y –DQB1*0201 (tablas 1 a la 4).

Tabla 1: Frecuencias (*g.f*) de los alelos HLA-A

HLA-A	n	<i>g.f</i>
A*02	246	0.322
A*24	125	0.164
A*68	88	0.115
A*01	45	0.059
A*31	45	0.059
A*03	28	0.036
A*30	28	0.036
A*11	26	0.034
A*29	24	0.031
A*26	23	0.030
A*33	21	0.027
A*23	19	0.024
A*32	12	0.015
A*25	10	0.013
A*66	7	0.009
A*34	4	0.005
A*74	4	0.005
A*69	3	0.003
A*36	2	0.002
AX	2	0.002

Tabla 2: Frecuencias (*g.f*) de los alelos HLA-B

HLA-B	N	<i>g.f</i>
B*35	128	0.168
B*39	78	0.102
B*51	60	0.078
B*61	58	0.076
B*44	52	0.068
B*65	37	0.048
B*62	36	0.047
B*08	28	0.036
B*07	26	0.034
B*18	25	0.032
B*49	17	0.022
B*38	16	0.021
B*48	16	0.021
B*41	15	0.019
B*15	14	0.018
B*57	14	0.018
B*52	13	0.017
B*53	12	0.015
B*13	11	0.014
B*27	10	0.013
B*60	10	0.011
B*45	9	0.011
B*64	9	0.010
B*58	8	0.010
B*37	8	0.009
B*50	7	0.007
B*55	6	0.006
B*4005	6	0.005
B*63	5	0.003
B*42	4	0.002
B*75	3	0.002
B*71	3	0.002
B*70	2	0.002
B*56	2	0.002
B*67	2	0.002
B*78	2	0.002
B*81	2	0.002

BX	2	0.002
B*54	1	0.001
B*4013	1	0.001
B*4014	1	0.001
B*47	1	0.001
B*72	1	0.001
B*73	1	0.001

Tabla 3: Frecuencias (*g.f*) de los alelos HLA-DRB1

HLA-DRB1	N	<i>g.f</i>
*04	196	0.257
*08	93	0.122
*07	69	0.090
*14	67	0.087
*13	66	0.086
*01	62	0.081
*17	54	0.070
*11	46	0.060
*15	45	0.059
*16	38	0.049
*10	12	0.015
*09	7	0.009
*12	6	0.007
*18	1	0.001

Tabla 4: Frecuencias (*g.f*) de los alelos HLA-DQB1

HLA-DQB1	N	<i>g.f</i>
*0302	181	0.237
*0301	158	0.207
*0201	124	0.162
*0501/02	107	0.140
*04	93	0.122
*0601/02	88	0.115
*0303	11	0.014

Las asociaciones más frecuentes del HLA -A/-B fueron A*24/-B*35, A*24/-B*39 y A*24/-B*4002.

Respecto a las asociaciones HLA-B/-DRB1 las más frecuentes fueron HLA-B*39/-DRB1*04, -B*4002/-DRB1*04 y -B*1402/-DRB1*01.

Algunas asociaciones de tres puntos frecuentemente encontradas fueron: A*02-B*39-DRB1*04, A*02-B*35-DRB1*04 y A*02-B*35-DRB1*08 (tablas 5 a la 8).

Tabla 5: asociaciones más frecuentes HLA-A/B encontradas en el estudio y en otras poblaciones

Asociación HLA-A/B	h.f	Δ'	E	AsA	AA	HA	Am
*24/*35	0.0472	0.1428	■		■	■	■
*24/*39	0.0301	0.1551					■
*24/*4002	0.0236	0.1674				■	■
*68/*4002	0.0170	0.1185				■	■
*29/*44	0.0170	0.5081	■			■	
*33/*1402	0.0144	0.4995	■			■	
*01/*08	0.0144	0.3547			■		■
*31/*51	0.0131	0.1624					■

E=europeos, AsA: asiáticos americanos, AA: africanos americanos, HA: españoles americanos, Am: amerindios. h.f=frecuencia haplotípica; Δ' =valor de delta estandarizado

Tabla 6: asociaciones más frecuentes HLA-B/DRB1 encontradas en el estudio y en otras poblaciones

Asociación HLA-B/DRB1	h.f	Δ'	E	AsA	AA	HA	Am
*39/*04	0.0538	0.3613				■	■
*4002/*04	0.0393	0.3382				■	■
*1402/*01	0.0341	0.6763	■			■	
*44/*07	0.0314	0.4070				■	
*08/*0301	0.0223	0.5771	■		■	■	
*39/*16	0.0144	0.2084					
*44/*01	0.0144	0.1417					
*07/*15	0.0144	0.3868	■			■	
*18/*0301	0.0118	0.3111	■				

E=europeos, AsA: asiáticos americanos, AA: africanos americanos, HA: españoles americanos, Am: amerindios. h.f=frecuencia haplotípica; Δ' =valor de delta estandarizado

Tabla 7: asociaciones más frecuentes HLA-DRB1/DQB1 encontradas en el estudio y en otras poblaciones

Asociación HLA-DRB1/DQB1	h.f	Δ'	E	AsA	AA	HA	Am
*04/*0302	.2335	0.9776	■			■	■
*08/*04	.1141	0.9265				■	■
*07/*02	0.0813	0.8635	■		■	■	
*01/*05	0.0787	0.9624		■	■		
*0301/*02	0.0682	0.9557	■		■	■	
*1402/*0301	0.0603	0.6183				■	■
*15/*06	0.0538	0.8995	■	■	■	■	
*13/*06	0.0524	0.5546		■	■		
*11/*0301	0.0511	0.8083	■	■		■	
*16/*0301	0.0380	0.7017					■

E=europeos, AsA: asiáticos americanos, AA: africanos americanos, HA: españoles americanos, Am: amerindios. h.f=frecuencia haplotípica; Δ' =valor de delta estandarizado

Tabla 8: asociaciones más frecuentes de HLA-A/B/DRB1 encontradas en el estudio y en otras poblaciones

Asociación HLA-A/B/DRB1	h.f	Δ'	E	AsA	AA	HA	Am
*02/*39/*04	0.022	0.8898					■
*02/*35/*04	0.016	0.2113				■	■
*02/*35/*08	0.014	0.6422				■	■
*68/*39/*04	0.014	0.8412					■
*24/*35/*04	0.013	0.0727					■
*33/*1402/*01	0.013	1.0000	■				■
*02/*4002/*04	0.012	0.4724					■
*68/*35/*04	0.012	0.5009					■
*29/*44/*07	0.011	0.7998	■			■	■
*01/*08/*0301	0.011	0.8437	■		■	■	
*24/*39/*04	0.011	0.2737					■
*02/*1501/*04	0.011	0.7873	■				■
*68/*4002/*04	0.011	0.5590					■
*24/*35/*16	0.011	0.7309					■

E=europeos, AsA: asiáticos americanos, AA: africanos americanos, HA: españoles americanos, Am: amerindios. h.f=frecuencia haplotípica; Δ' =valor de delta estandarizado

Los haplotipos más frecuentemente observados fueron: A*02-B*39-DRB1*04-DQB1*0302, A*02-B*35-DRB1*04-DQB1*0302, A*68-B*39-DRB1*04-DQB1*0302, A*02-B*35-DRB1*08-DQB1*04, A*33-B*1402-DRB1*01-DQB1*05, y A*02-B*35-DRB1*08-DQB1*04 (Tabla 9).

Tabla 9: Frecuencias de los haplotipos HLA-A/B/DRB1/DQB1 en el estudio

HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DQB1	n	h.f	Δ'	Haplotipos previamente reportados: población, frecuencia
*02	*39	*04	*0302	17	0.022	0.9759	Mazatecas 0.108; Mayas 0.042
*02	*35	*04	*0302	12	0.016	0.31511	Mayas 0.106; Mazatecas 0.025; Nahuas 0.020
*68	*39	*04	*0302	11	0.014	0.8700	Mayas 0.064
*02	*35	*08	*04	11	0.014	0.6749	Aimaras 0.104; quechuas 0.065; mayas 0.084
*33	*1402	*01	*05	10	0.013	1.0000	Muricios 0.016; Españoles 0.019;; Tunecinos 0.040
*24	*35	*04	*0302	10	0.013	0.1656	Mazatecas 0.025; Aimaras 0.031; Quechuas 0.014
*02	*4002	*04	*0302	9	0.012	0.5464	Aimaras 0.023; Mayas 0.007
*68	*35	*04	*0302	9	0.012	0.5464	Mayas 0.023; Aimaras 0.039; Nahuas 0.020
*68	*4002	*04	*0302	8	0.011	0.5913	Tenek 0.029, Esquimales; Zapotecos, Mixtecos
*24	*35	*16	*0301	8	0.011	0.7757	Zapotecos; Mixtecos
*29	*44	*07	*02	8	0.011	0.8102	Muricios 0.052; Vascos 0.075; Tunecinos 0.040
*01	*08	*0301	*02	8	0.011	0.8442	Muricios 0.024; Peruanos 0.017
*24	*39	*04	*0302	8	0.011	0.3329	Mazatecos 0.033
*02	*1501	*04	*0302	8	0.011	0.4621	Muricios 0.016
*02	*1501	*08	*04	7	0.009	0.5313	Mestizos encontrados en este estudio
*02	*39	*08	*04	7	0.009	0.3292	Aimaras 0.034
*02	*44	*07	*02	7	0.009	0.6236	Muricios 0.016; Españoles 0.019
*02	*51	*08	*04	6	0.008	0.2955	Mestizos encontrados en este estudio
*24	*4002	*04	*0302	6	0.008	0.2092	Nahuas 0.034; Mixtecos 0.030
*02	*51	*11	*0301	6	0.008	0.5045	Portugueses 0.053
*24	*35	*11	*0301	6	0.008	0.4705	Europeos centro
*24	*39	*14	*0301	6	0.008	0.5208	Nahuas 0.054
*02	*39	*16	*0301	5	0.007	0.4469	Mazatecos 0.033
*31	*51	*04	*0302	5	0.007	0.3317	Portugueses 0.053
*31	*51	*08	*04	5	0.007	0.4259	Mestizos encontrados en este estudio
*30	*13	*07	*02	5	0.007	0.5181	Euroasiáticos; Norte de China 0.031
*24	*35	*14	*0301	5	0.007	0.3497	Aimaras 0.028; Quechuas 0.014

*02	*35	*01	*05	4	0.005	0.1602	Mestizos encontrados en este estudio
*03	*07	*15	*06	4	0.005	0.3977	Vascos 0.025; Españoles 0.011
*02	*1402	*01	*05	4	0.005	0.3518	No reportados previamente
*02	*44	*01	*05	4	0.005	0.2908	No reportados previamente
*24	*48	*04	*0302	4	0.005	0.2406	No reportados previamente
*24	*4002	*08	*04	4	0.005	0.1941	No reportados previamente
*03	*08	*0301	*02	4	0.005	0.3837	No reportados previamente
*68	*35	*08	*04	4	0.005	0.1941	No reportados previamente
Otros				463	<0.003		

h.f= frecuencia haplotípica; Δ' =valor de delta estandarizado

Los haplotipos encontrados según el área geográfica en estudio fueron: HLA-A*02, B*39, DRB1*04, DQB1*0302 y HLA-A*68, B*39, DRB1*04, DQB1*0302 haplotipos frecuentes en la población de la Ciudad de México.

Los haplotipos HLA-A*02, -B*35, -DRB1*08, -DQB1*04, HLA-A*02, B*39, DRB1*16, DQB1*0301 y HLA-A*02, B*39, DRB1*04, DQB1*0302 haplotipos muy comunes en la población del estado de Puebla y los haplotipos HLA-A*33, B*1402, DRB1*01, DQB1*05 y HLA-A*02, B*1501, DRB1*04, DQB1*0302 para el estado de Sinaloa (tablas 10, 11 y 12).

Tabla 10: haplotipos frecuentes encontrados en la población de la Ciudad de México

A	B	DRB1	DQB1	h.f	Δ'	Am	E	AA
*02	*39	*04	*0302	0.0289	1.0000			
*68	*39	*04	*0302	0.0248	0.8952			
*24	*35	*04	*0302	0.0165	0.1240			
*24	*35	*16	*0301	0.0165	0.6833			
*02	*4002	*04	*0302	0.0124	0.2762			
*02	*1402	*01	*05	0.0124	0.4873			
*01	*08	*0301	*02	0.0124	0.5417			
*02	*35	*08	*04	0.0124	0.2667			
*31	*35	*04	*0302	0.0124	0.1906			
*31	*35	*08	*04	0.0124	0.3905			

E=europeos, AA: africanos americanos, Am: amerindios.

h.f=frecuencia haplotípica; Δ' =valor de delta estandarizado

Tabla 11: haplotipos frecuentes encontrados en la población del estado de Puebla

A	B	DRB1	DQB1	h.f	Δ'	Am	E	AA
*02	*35	*08	*04	0.0303	0.8141	■		
*02	*39	*16	*0301	0.0253	1.0000			
*02	*39	*04	*0302	0.0253	0.5075			
*24	*4002	*04	*0302	0.0202	0.5729			
*68	*35	*04	*0302	0.0202	0.5729			
*24	*35	*04	*0302	0.0152	0.3869	■		
*24	*35	*16	*0301	0.0152	0.6080			
*02	*51	*08	*04	0.0152	0.3869		■	
*02	*1501	*04	*0302	0.0152	0.3793		■	
*02	*1501	*08	*04	0.0152	0.4321			■

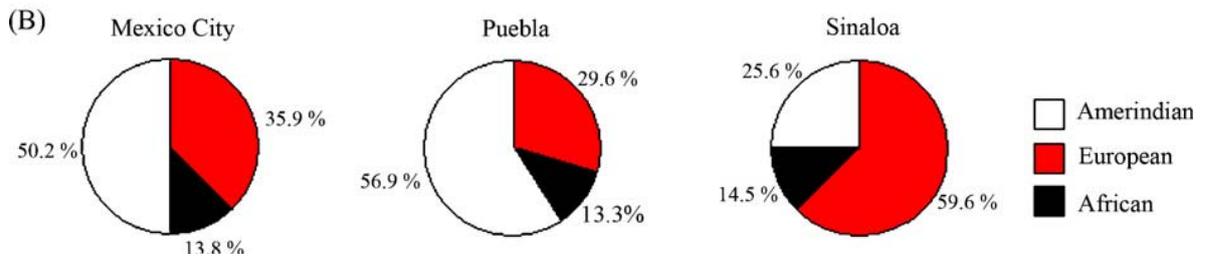
E= europeos, AA: africanos americanos, Am: amerindios.
h.f=frecuencia haplotípica; Δ' =valor de delta estandarizado

Tabla 12: haplotipos frecuentes encontrados en la población del estado de Sinaloa

A	B	DRB1	DQB1	h.f	Δ'	Am	E	AA
*24	*39	*04	*0302	0.0268	1.0000	■		
*02	*1501	*04	*0302	0.0179	0.7275		■	
*31	*51	*04	*0302	0.0179	0.7275		■	
*03	*08	*0301	*0301	0.0179	0.8483			■
*33	*1402	*01	*05	0.0179	0.7718		■	
*02	*51	*11	*0301	0.0179	0.7960		■	
*02	*39	*04	*0302	0.0179	0.5502	■		
*24	*35	*11	*0301	0.0179	0.8322		■	
*26	*27	*15	*06	0.0179	0.8080			■
*68	*4002	*04	*0302	0.0179	0.7275	■		

E= europeos, AA: africanos americanos, Am: amerindios.
h.f=frecuencia haplotípica; Δ' =valor de delta estandarizado

La estimación de la ancestría obtenida mediante el método de máxima verosimilitud, mostró un alto componente genético europeo en el estado de Sinaloa (59.6%), si se compara con el estado de Puebla y la Ciudad de México, en donde se encontró una alta proporción de componente genético amerindio (56.2% y 50.2% respectivamente).



Con el mismo método, la estimación del componente africano resultó de un 14% en las poblaciones en estudio.

El análisis basado en las frecuencias de haplotipos HLA-A-B-DRB1-DQB1 étnico específicos, mostraron la existencia del 27.7% de haplotipos amerindios, 16.6% de haplotipos europeos, 3.5% de haplotipos africanos y 52.0% de haplotipos mestizo mexicanos para el caso de Puebla; 13.3%, 25.8%, 2.6% y 58.0% respectivamente para el caso de Sinaloa y 22.7%, 14.0%, 4.9% y 58.2% respectivamente para el caso de la Ciudad de México.

2.3 Discusión

En el estudio se reporta una elevada frecuencia del número de alelos de los genes HLA-A y HLA-B; esto se puede deber al tamaño de la muestra así como a la diversidad de las poblaciones estudiadas.

Los alelos HLA-A y HLA-B más frecuentes fueron: HLA-A *02, -A*24 y -A*68 y HLA-B*35, -B*39 y -B*61.

Por otro lado, para los alelos HLA de clase II, el HLA-DRB1*04, -*08 y -*07 fueron los más frecuentes; para el caso de los alelos HLA- DQB1 los más frecuentes fueron *0302, *0301 y *0201.

Respecto a los bloques formados por los alelos HLA-A/-B y HLA-B/-DRB1, las asociaciones más frecuentes fueron HLA-A*24/-B*35, -A*24/-B*39, -A*24/-B*4002; HLA-B*39/-DRB1*04, -B*4002/-DRB1*04 y -B*1402/-DRB1*01.

Las asociaciones HLA-DRB1/-DQB1 muestran la gran diversidad respecto a los bloques anteriores; las más frecuentes fueron HLA-DRB1*04/-DQB1*0302, DRB1*08/-DQB1*04 y -DRB1*07/-DQB1*02 con altos valores de desequilibrio de ligamiento, lo que nos indica que son asociaciones muy fuertes.

La contribución de haplotipos europeos en la constitución genética del estado de Sinaloa es clara, en virtud de que la mitad de los haplotipos más comunes encontrados en esta población tienen un componente europeo.

Para este estado (Sinaloa), nunca antes se habían realizado estimaciones de mestizaje, y los resultados son consistentes con lo anteriormente mencionado: poseen una alta contribución genética europea así como en la mayor parte del noroeste del país.

En contraste, las estimaciones de la contribución genética amerindia en la Ciudad de México y Puebla fueron cerca del 50%.

En el contexto de comparar frecuencias de alelos y haplotipos de mestizos mexicanos con otros grupos étnicos, encontramos que los alelos HLA-A y HLA-B más comunes para esta población también lo son entre las poblaciones amerindias de México, centro y Sudamérica (Vargas-Alarcón et al., 2006; Arnaiz-Villena et al., 2005).

Situación similar ocurre con los alelos HLA-DRB1-*04 y -*08 que son considerados marcadores de poblaciones amerindias (Arnaiz-Villena et al., 2000; Arnaiz-Villena et al., 2005).

Así mismo, los alelos HLA- DQB1 *0302 y *0301 han sido reportados en poblaciones amerindias (Arnaiz- Villena et al., 2000) mientras que el tercero es frecuente en poblaciones europeas (Sánchez-Velasco et al., 2003).

Esto es, se ha descrito previamente una elevada frecuencia de dichos alelos -de clase I y clase II- en mestizos mexicanos y en otros grupos amerindios (Arnaiz-Villena et al., 2000; Vargas-Alarcón et al., 2006).

Los cuatro haplotipos más comunes encontrados durante nuestro estudio incluyen a aquellos previamente reportados en poblaciones amerindias (Arnaiz-Villena et al., 2000; Gómez-Casado et al 2003; Lázaro et al., 2003; de Pablo et al., 2000) lo cual es concordante con el proceso histórico, y por ende con la composición genética de los mexicanos, mostrando que los habitantes de México tienen un importante componente amerindio.

Las poblaciones nativas de América han estado en contacto con mestizos mexicanos sólo con algunas restricciones, dando la posibilidad de mezcla pero preservando los genes nativos. A pesar de esto, algunos de los haplotipos encontrados en el estudio, han sido reportados en poblaciones europeas, mostrando así su contribución en el componente de la diversidad genética actual.

Nuestros resultados son importantes para futuros estudios genéticos comparativos de diferentes grupos étnicos de México, así como para estructurar la genética de la población mexicana.

Igualmente, estos análisis son útiles en los estudios epidemiológicos (asociaciones entre enfermedades y el HLA) y la creación de programas de trasplantes.

Las diferencias que se pueden llegar a encontrar en la contribución ancestral entre los distintos grupos mestizos justifica la necesidad de contar con grupos control bien caracterizados para elaborar estudios de asociación que controlen la variación etnogenética de acuerdo a la procedencia de la muestra.

2.5 Conclusiones

A través de este trabajo se constata que la única manera confiable de estudiar bloques genéticos en marcadores autosómicos sujetos a recombinación es la tipificación de tríadas padre-madre-hijo para armar haplotipos, teniendo un reflejo fiel de la asociación en vez de una estimación estadística.

Así también, las frecuencias haplotípicas y el desequilibrio de ligamiento (LD) resultan ser muy útiles, ya que caracterizan claramente la distribución de los genes del HLA dentro de las poblaciones.

Los resultados del estudio son de baja resolución y pueden ser un precedente para futuros estudios así como para la creación de genotecas que nos permitan intercambiar información a nivel mundial, sin embargo éstos tienen que ser de alta resolución.

Dadas las características del sistema genético del HLA, (en la que existe una estructura definida para funciones definidas) nos permite conocer la evolución de la variabilidad genética de los humanos y su interacción con el medio ambiente, en particular con las infecciones.

3. Revisión bibliográfica

1. Abbas, Abul. Inmunología celular y molecular. ELSEVIER 5ª edición 2003
2. Ardille, K., Kruglyak, L., and Seielstad, M., 2002. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. Nature Publishing Group
3. Arnaiz-Villena, A., Vargas-Alarcon, G., Granados, J., Gomez-Casado, E., Longas, J., Gonzalez-Hevilla, M., Zuniga, J., Salgado, N., Hernandez-Pacheco, G., Guillen, J., Martinez-Laso, J., 2000. HLA alleles in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 56, 405–416.
4. Arnaiz-Villena, A., Siles, N., Moscoso, J., Zamora, J., Serrano-Vela, J.I., Gomez-Casado, E., Castro, M.J., Martinez-Laso, J., 2005. Origin of Aymaras from Bolivia and their relationship with other Amerindians according to HLA genes. *Tissue Antigens* 65, 379–390.
5. Choisy, M., Franck, P., Cornuet, M., 2003. Estimating admixture proportions with microsatellites: comparison of methods based on simulated data. *Molecular Ecology* 13, 955-968
6. de Pablo, R., Beraun, Y., Nieto, A., Calzada, J.E., Rementeria, M.C., Sanz, L., Lopez-Nevot, M.A., Martin, J., 2000. HLA class I and class II allele distribution on the Peruvian population. *Tissue Antigens* 56, 507
7. Freeman, Scott. Análisis evolutivo, Prentice Hall, 2ª edición 2002
8. García-Ortiz, J.E, Sandoval-Ramírez, L, Rangel-Villalobos H. Maldonado-Torres, S. Cox, C., Moscoso, J, A. Arnaiz-Villena, A., Arguello, J.R. High-resolution molecular characterization of the HLA class I and class II in the Tarahumara Amerindian population. *Tissue Antigens*
9. Griffiths, A.J. *et al* Introducción al análisis genético. 9ª edición. McGraw-Hill Interamericana, 2008
10. Hammond, M.G., Du Toit, E.D., Sanchez-Mazas, A., Andrien, M., Coluzzi, M., De Pablo, M.R., De Stefano, G., Kaplan, C., Kennedy, L., Louie, L., Migot, F., 1997. HLA in sub-Saharan Africa. In: Charron, D. (Ed.), *Genetic Diversity of HLA: Functional and Medical Implication*. 12th International Histocompatibility Workshop. EDK, Sevres France, pp. 345–353.
11. Joblin, M.A, *et al* Human Evolutionary Genetics. Garland Publishing, 2004
12. Lazaro, A.M., Moraes, M.E., Marcos, C.Y., Moraes, J.R., Fernandez-Vina, M.A., Stastny, P., 1999. Evolution of HLA-class I compared to HLA-

- class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe. *Hum. Immunol.* 60, 1138–1149.
13. Muro, M., Marin, L., Torio, A., Moya-Quiles, M.R., Minguela, A., Rosique-Roman, J., Sanchis, M.J., García-Calatayud, M.C., García-Alonso, A.M., Álvarez-López, M.R., 2001. HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): In the cradle of the archaeological Iberians. *Hum. Immunol.* 62, 910–921.
 14. Lisker, R., Pérez-Briceno, R., Granados, J., Babinsky, V., de Rubens, J., Armendares, S., Buentello, L., 1986. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am. J. Phys. Anthropol.* 71, 203–207.
 15. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999: 401: 921–3.
 16. Vargas-Alarcón, G., Juan Moscoso, J. Martínez-Laso, J., Rodríguez-Pérez, J.M., Flores-Domínguez, C., Serrano-Vela, J.I., Moreno, A., Granados, J., Arnaiz-Villena, A., 2006. Origin of Mexican Nahuas (Aztecs) according to HLA genes and their relationships with worldwide populations. *Molecular Immunology*
 17. Yunis, E.J., Zúñiga, J., Larsen, C.E., Fernández-Viña, M., Granados, J., Awdeh, Z.L., Alper, C.A., 2005. Single Nucleotide Polymorphism blocks and haplotypes: Human MHC block diversity. In: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, vol. 13, second ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, DE, pp. 191–215.
 18. Wang, J., 2003. Maximum likelihood estimation of admixture proportions from genetic data. *Genetics* 164, 747–765.
 19. <http://www.mhcdatabase.com>
 20. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>
 21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/>
 22. <http://www.rubic.rdg.ac.uk/-mab/software.html>

4. Anexos

Anexo I: equipo, material y reactivos

a) Extracción de sangre

Reactivos:

- Sangre total periférica anticoagulada con EDTA
- BD1*
- BD2*
- BD3*
- BD4*
- Etanol absoluto
- Etanol 70%

*incluidos en el kit

Material:

- Puntas p/micropipeta 200 mL
- Puntas p/micropipeta 1000 mL
- Tubos eppendorff

Equipo:

- Microcentrífuga
- Baño María
- Micropipetas 5 – 50 μ L, 40 – 200 μ L, 100 – 1, 000 μ L

b) Tipificación del HLA por PCR-SSP (Pel-Freeze)

Reactivos:

- ddH₂O
- Buffer de PCR 10x **
- Primers específicos*
- dNTP's*
- MgCl₂**
- TAQ DNA polimerasa

- DNA 20 – 225 ng / μL , $A_{260}/A_{280} = 1.64 - 2.0$

* incluidos en las placas del kit

** incluidos en la master mix

Material:

- Baño de hielo
- Soporte para tubos
- Puntas p/micropipeta 200 μL

Equipo:

- Termociclador programable
- Micropipetas de 5 – 50 μL y 1.0 – 10.0 μL

c) Electroforesis

Reactivos:

- Agarosa pura
- Solución amortiguadora TBE 10x
- Solución amortiguadora TBE 0.5x
- Bromuro de etidio

Material:

- Puntas para micropipetas
- Balanza
- Espátula
- Matraces Erlenmeyer
- Horno de microondas

Equipo:

- Cámara de electroforesis
- Caja de voltaje
- Lámpara UV
- Micropipetas

Anexo II: metodologías

a) Extracción de sangre

1. A un tubo eppendorff limpio añadir 500 μ L de sangre total periférica y 500 μ L de BD1
2. Centrifugar a 10,000 RPM durante 1 minuto
3. Decantar el sobrenadante y dejar secar el borde del tubo en una gasa boca abajo
4. Resuspender con pipeteo el botón en 500 μ L de BD2
5. Centrifugar a 10,000 RPM durante 1 minuto
6. Decantar el sobrenadante y dejar secar el borde del tubo en una gasa boca abajo
7. Resuspender el botón en 120 μ L de BD3
8. Incubar durante 15 – 45 minutos en baño maría a 50 – 60 °C
9. Agregar 40 μ L de BD4 y agitar en vortex. Centrifugar durante 3 minutos a 10,000 RPM
10. Trasvasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 500 μ L de etanol absoluto
11. Mezclar por inversión hasta que aparezca la malla de DNA y centrifugar a 10,000 RPM durante 3 minutos
12. Decantar el sobrenadante y lavar el botón con 500 μ L de etanol 70%
13. Centrifugar a 10,000 RPM durante 2 minutos
14. Decantar el sobrenadante y dejar secar por completo antes de resuspender el 100 μ L de TE

b) Tipificación del HLA

1. Descongelar una de las alícuotas de “master mix” del kit y añadir 268 μ L de H₂O.
2. Agregar 9.3 μ L de TAQ DNA polimerasa 5 U / μ L y homogeneizar por pipeteo suave.
3. Colocar 8 μ L de la mezcla en el pozo control dejando resbalar la mezcla por la pared del tubo

4. Añadir 80 μL de DNA a la mezcla y homogeneizar bien.
5. Colocar 8 μL de la mezcla en cada uno de los 95 pozos restantes.
6. Correr el programa de Pel-Freez A/B/DR/DQ

c) Electroforesis

Preparación de la gelatina de agarosa

1. Determinar la concentración y el volumen de agarosa que se necesita.
Preparar la gelatina al por ciento deseado:
Pesar la cantidad de gelatina que se necesita y transferir a un matraz Erlenmeyer. Añadir el volumen deseado de solución amortiguadora Borato-Tris-EDTA
2. Calentar en un horno microondas hasta que se disuelva la agarosa totalmente.
3. Enfriar la agarosa hasta 50 °C
4. Verter la solución de agarosa en el plato evitando la formación de burbujas y previamente nivelado
5. Dejar que el gel solidifique a temperatura ambiente

Cargar las muestras

1. Colocar la gelatina dentro de la cámara de electroforesis.
2. Añadir suficiente TBE 0.5X hasta cubrir completamente la gelatina
3. Cargar cuidadosamente ~ 10 μl de muestra por pozo utilizando una micropipeta.
4. Conectar el equipo, seleccionar el voltaje deseado, correr la electroforesis hasta que las muestras hayan migrado aproximadamente entre la mitad y tres cuartos del plato de gelatina.

Visualización del DNA con bromuro de etidio

1. Colocar el gel bajo una lámpara de luz UV en la que se verán claramente las bandas obtenidas.

Anexo III: preparación de reactivos

a) Extracción de DNA

Alcohol al 70%

Concentración	Volumen final	Volumen de etanol 100%	Volumen de dH ₂ O
70 %	500 mL	350	150
	1000 mL	700	300

b) Electroforesis

Buffer TBE 10x (Tris base / Boric acid / EDTA)

Reactivo	Cantidad
Tris base	107.8 g
Ácido bórico	55 g
EDTA	7.44g
dH ₂ O	1000 mL

Una vez pesadas las sales, se colocan en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se agregan aproximadamente 300 mL de dH₂O, se calienta hasta disolver las sales, y la solución, una vez fría, se afora a 1,000 mL.

Buffer TBE 0.5x (Tris base / Boric acid / EDTA)

Reactivo	Cantidad
Buffer TBE 10x	50 mL
dH ₂ O	950 mL

Gel de agarosa (Agarosa x% m / V)

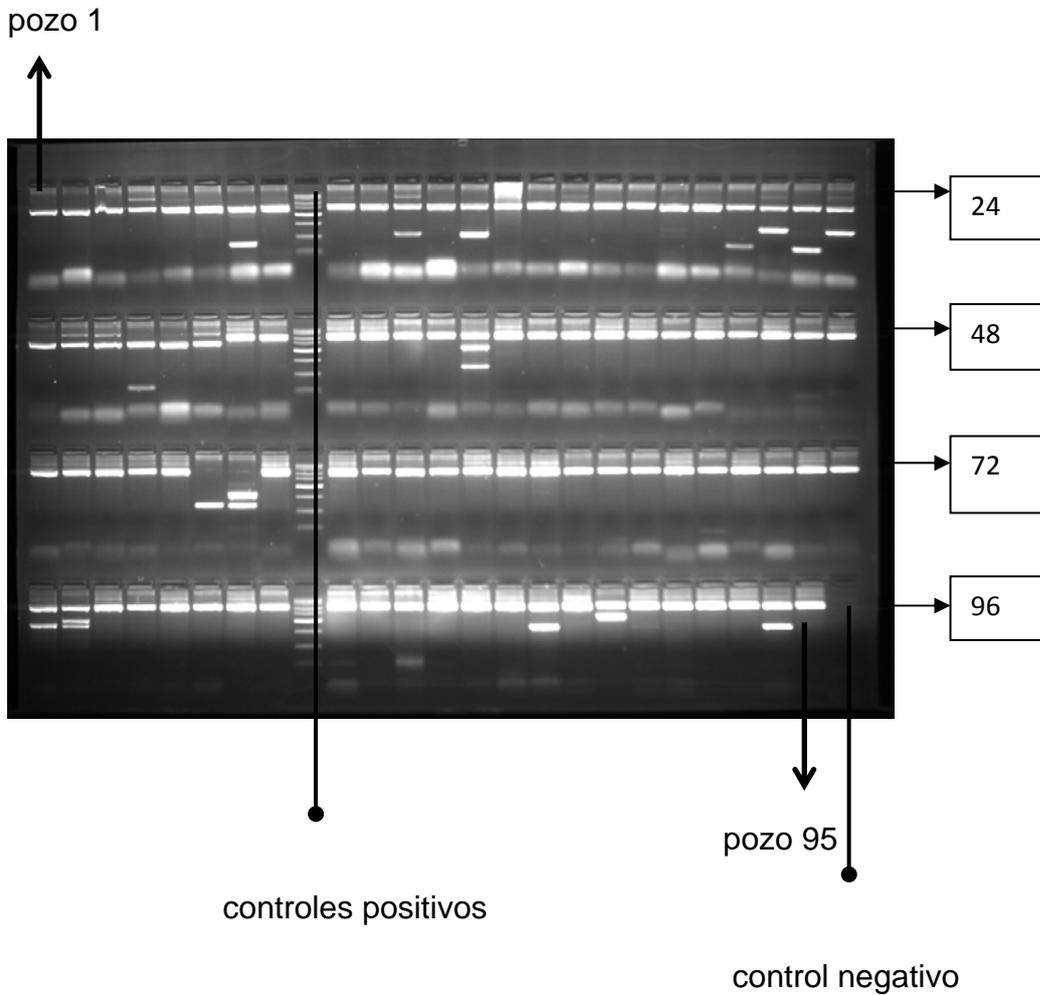
Concentración % m / V (g agarosa / 100 mL sol)		M agarosa (g)	V Buffer TBE 0.5x (mL)	V Bromuro de Etidio (μ L)
1%	60	0.6	60	0.6
1%	120	1.2	120	1.2
1.50%	60	0.9	60	0.9
1.50%	120	1.8	120	1.8
2%	60	1.2	60	1.2
2%	120	2.4	120	2.4
2.50%	60	1.5	60	1.5
2.50%	120	3	120	3
3%	60	1.8	60	1.8
3%	120	3.6	120	3.6

Se colocan los gramos pesados de agarosa en un matraz Erlenmeyer o de bola de fondo plano, se añade el buffer TBE 0.5 x deslizándolo por las paredes y se calienta en horno de microondas (un minuto aproximadamente), se agita y se coloca de nuevo en el microondas (45 segundos aproximadamente). Enfriar a 40 - 50 ° C y añadir el bromuro de etidio. Homogeneizar adecuadamente y verter en el molde previamente nivelado.

Anexo IV: interpretación de geles

La placa del kit consta de 100 pozos:

- 95 para las muestras
- 4 para el control positivo
- 1 para el control negativo



Del pozo 1 al 23 se leen los alelos de clase II DR
Del pozo 24 al 30 se leen los alelos de clase II DQ
Del pozo 31 al 53 se leen los alelos de clase I A
Del pozo 54 al 95 se leen los alelos de clase I B

En el ejemplo, los siguientes pozos es donde corrieron las muestras:

Pozos correspondientes a los alelos DR: 7, 11, 13, 21, 22, 23

Pozos correspondientes a los alelos DQ: 24 y 28

Pozos correspondientes a los alelos A: 37

Pozos correspondientes a los alelos B: 55, 73, 74, 87, 89 y 94

Según los pozos en donde corrieron las muestras, se extrapolan los números correspondientes obtenidos con su equivalente serológico:

Serological Equivalent	Allele Specificity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
DR1, -	DRB1*010101-0204/04-13/15/16	1																														
DR103	DRB1*0103		2																													
	DRB1*0114	1																	18													
DR15(2), DR2, -	DRB1*150101-20/22			3																	20											
	DRB1*1521			3																	20											
DR16(2), DR2, -	DRB1*160101-0502/07/08/11				4																											
	DRB1*1609/10			3	4								12																			
DR17(3), DR3, -	DRB1*030101/0102/04-07/09-28/30/31					5						11										21										
DR18(3), -	DRB1*030201-03/29					5	6					11																				
	DRB1*0308					5			8											19		21										
DR4, -	DRB1*040101-11/13/14/16/17/19- 21/23/26/27/29-34/36-41/44-57/60/63							7																								
DR4	DRB1*0412/18/25/58							7														20										

Para este caso, el pozo número 7 equivale al alelo DR*4

Serological Equivalent	Allele Specificity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
DR13(6), -, DR6	DRB1*130101-0202/08/16/20/27- 29/31/32/34-36/39-41/43/51/52/59-61/63- 65/68/69/71/73										10	1										21									
DR13(6), -	DRB1*130301- 04/0701/0702/12/13/15/19/22- 24/33/37/38/47-49/53/55/57/58/70/75										10	1																			
DR13(6)	DRB1*130501-06/42										10	1	12									21									
-	DRB1*1309										10	1		1								21									
DR13(6)	DRB1*1310										10	1	12		14							20	21								
DR13(6), -	DRB1*1311/1401/1402/21/30/46/50/62/66										10	1	12																		
DR13(6)	DRB1*1317			2														16													
DR13(6)	DRB1*1318										10	1			14							20	21								
-	DRB1*1325/44											1	12																		
-	DRB1*1326							6			10	1																			
-	DRB1*1345			2							10	1							18												
DR14 (6)	DRB1*1354										10	1									19										
-	DRB1*1356											1	12										21								
-	DRB1*1367				3						10								17												
-	DRB1*1372										10	1										20	21								
-	DRB1*1374											1							18				21								
DR14(6), -	DRB1*140101- 0103/14/2301/26/32/36/44/54/59/60/62											11		13									21								
DR14(6), DR1403, -	DRB1*1402- 0302/06/13/19/20/29/40/41/47/48/51											11			14																

En este caso los pozos 11, 13 y 21 corresponden al alelo DR*14

Serological Equivalent	Allele Specificity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
DR52, -	DRB3*01010201-02/04-08/10/11, DRB3*0201-03/05-14/17/18/20/21, DRB3*030101-02																						22									
-	DRB3*0103/09, DRB3*0204/19/22, DRB3*0303					6																	22									
-	DRB3*0215																	17					22									
-	DRB3*0216		2																				22									
DR53, -	DRB4*01010101-030101/0302-07																															
Null	DRB4*01030102N																							23								
DR51, -	DRB5*010101-13, DRB5*0202-05																								23							
DQ5(1), -	DQB1*050101-05																								24							
DQ6(1), - DQ1	DQB1*060101-30																									25						
DQ2, -	DQB1*020101-04																										26					
DQ7(3), - DQ8(3)	DQB1*030101-0103/04/09/10/13/14/16/19																											27				
DQ8(3), -	DQB1*030201-0204/0501-0504/07/08/11/18																												28			
DQ9(3), DQ3, -	DQB1*030302/0303/06/12/15/17																													29		
DQ4	DQB1*0401/02																													29	30	

Finalmente el pozo 22 corresponde al alelo DR*52 y el pozo 23 al alelo DR*53.

Así, obtenemos para el caso del DR:

- DR*4
- DR*14
- DR*52
- DR*53

De esta manera se realiza para los demás alelos para obtener la lectura completa del gel.



Short communication

HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico

Rodrigo Barquera^{a,b}, Joaquín Zúñiga^{c,d}, Raquel Hernández-Díaz^b, Victor Acuña-Alonzo^{a,b},
Karla Montoya-Gama^a, Juan Moscoso^e, Diana Torres-García^a, Claudia García-Salas^f,
Beatriz Silva^g, David Cruz-Robles^h, Antonio Arnaiz-Villena^e,
Gilberto Vargas-Alarcón^{i,**}, Julio Granados^{j,*}

^a Molecular Genetics Laboratory, ENAH, Mexico City, Mexico

^b Physiology, Biochemistry and Genetics Laboratory, ENAH, Mexico City, Mexico

^c Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana Farber Cancer Institute and Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA

^d Laboratory of Immunobiology and Genetics, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico

^e Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid and The Regional Madrid Blood Center, Madrid, Spain

^f Department of Pharmacy, Chemistry Faculty, UNAM, Mexico City, Mexico

^g Unidad de Investigación Biomédica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, N.L., Mexico

^h Department of Pathology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

ⁱ Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, Mexico City, Mexico

^j Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Col. Sección XVI, Tlalpan 14050, Mexico City, Mexico

Received 4 May 2007; received in revised form 28 July 2007; accepted 31 July 2007

Abstract

We studied HLA class I and class II alleles in 191 Mexican families (381 non-related individuals) to directly obtain the HLA-A/B/DRB1/DQB1 haplotypes and their linkage disequilibrium (LD). The most frequent HLA haplotypes observed were: A*02-B*39-DRB1*04-DQB1*0302, A*02-B*35-DRB1*04-DQB1*0302, A*68-B*39-DRB1*04-DQB1*0302, A*02-B*35-DRB1*08-DQB1*04, A*33-B*1402-DRB1*01-DQB1*05, and A*24-B*35-DRB1*04-DQB1*0302. The four most common haplotypes found by our study involve those previously reported in Amerindian populations. LD analysis of HLA-A-B and HLA-B-DRB1 loci showed significant associations between A29(19)-B44(12), A33(19)-B65(14), A1-B8, A26(19)-B44(12), A24(9)-B61(40), B65(14)-DR1, B8-DR17(3), B44(12)-DR7, B7-DR15(2), and B39(16)-DR4. Also, all DRB1-DQB1 associations showed significant LD values. Admixture estimations using a trihybrid model showed that Mexicans from the State of Sinaloa (Northern Mexico) have a greater proportion of European genetic component compared with Mexicans from the Central area of Mexico, who have a greater percentage of Amerindian genes. Our results are important for future comparative genetic studies of different Mexican ethnic groups with special relevance to disease association and transplantation studies.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Admixture; Haplotypes; HLA; Linkage disequilibrium; Major histocompatibility complex (MHC); Mexican populations; Transplant

1. Introduction

Major histocompatibility complex (MHC) genes and in particular human leukocyte antigen (HLA) genes are the most

polymorphic genetic system in humans (Prugnolle et al., 2005). The analysis of HLA genes is important in the study of evolution, human diversity, disease association and population genetics (Chakraborty, 1986). The study of HLA polymorphisms also improve the knowledge about haplotypic frequencies, helpful in designing volunteer donor programs and cord cells banks, to give the possibility of identifying potential cell and organ donors, improving the health policies. Even though nowadays frequencies of HLA haplotypes differ significantly among

* Corresponding author. Tel.: +5255 54850080; fax: +5255 55732911.

** Corresponding author. Tel.: +5255 55732911x1278

E-mail addresses: gvargas63@yahoo.com (G. Vargas-Alarcón), julgrate@yahoo.com (J. Granados).

human populations (Cao et al., 2001), the differences have been relatively diminished with the presence of constant genetic flow because of admixture events. Haplotypic frequencies and linkage disequilibrium (LD) can be very informative, since they characterize HLA gene worldwide distribution within populations more clearly (Ahmad et al., 2003). The existence of conserved DNA regions maintained from generation to generation through relatively absent genetic recombination has been described for the HLA genetic system (Yunis et al., 2003). These conserved DNA blocks, containing specific allele combinations of nearby loci within the HLA region, have been observed to be shared by many unrelated individuals of well-characterized human populations; longer stretches of these DNA sequences are known as 'conserved extended haplotypes' (CEHs) (Yunis et al., 2003; Yunis et al., 2005). Admixture events generate new allelic variants or new CEHs within a population.

The aim of the present study is to describe the frequency of HLA haplotypes obtained by pedigree analysis in Mexican Mestizo individuals from different geographical regions of Mexico and estimate genetic admixture between ancestral Amerindian, European, and African populations.

2. Materials and methods

2.1. Families

The study included 191 Mexican families (381 non-related individuals) from several regions of the country (suggested as

the most ethnically diverse geographical regions). All families consisted of father, mother and their children, mainly from North and Central Mexico (Fig. 1A). These tests were performed for matching either solid organ or bone marrow transplant donor-recipient couples. Neither, the transplant recipients, donors or relatives were known to have autoimmune conditions.

2.2. HLA typing

All individuals were typed for HLA class I (HLA-A, HLA-B) and HLA class II (HLA-DRB1, HLA-DQB1) by a PCR-SSP procedure (Pel-Freez HLA-A/B/DR/DQ SSP Unitray®, Brown Deer, Wisconsin, USA).

2.3. Statistical analysis

HLA allele and haplotype frequencies were obtained by gene counting. Hardy–Weinberg (HW) equilibrium and LD were calculated with Arlequin ver. 2.0. The admixture estimations were carried out using the HLA-B typing of our sample in a tri-hybrid model with the *maximum likelihood* method using the software Leadmix (Wang, 2003). The HLA-B frequencies of the following parental populations were used for the analysis: Spaniards (Murcians; Muro et al., 2001), Africans (Hammond et al., 1997) and Amerindians (Nahuas; Vargas-Alarcon et al., 2007). In addition, the proportion of Amerindian, European, African, Asian and Mexican admixed specific haplotypes in our sample were calculated based on the frequencies of ethnic-

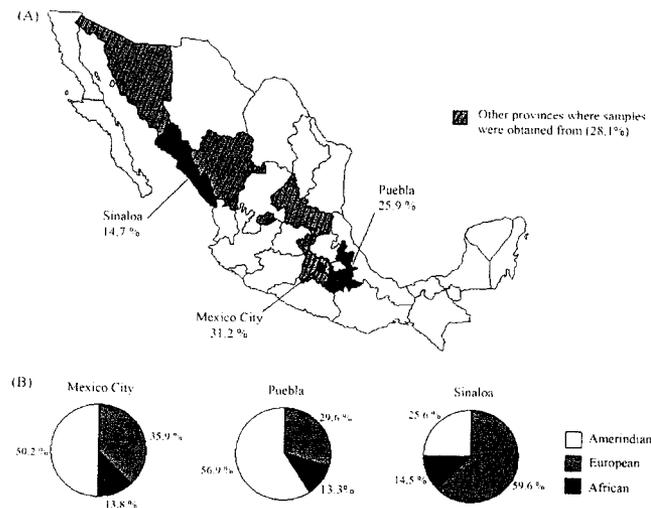


Fig. 1. Panel A: Map of Mexico and the origin of the families. Seventy one point nine percent of the samples were obtained from Mexico City, Puebla and Sinaloa States (black color). The remaining 28.1% of the samples were obtained from other provinces (green color). Panel B: Ancestral contributions for Mexico City, Puebla and Sinaloa States. The admixture estimations of the parental populations (Amerindian (white), European (red) and African (black)) in the samples from Mexico City, Puebla and Sinaloa States were calculated by the maximum likelihood method and are represented in pie charts. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

specific HLA-A/-B/-DRB1/-DQB1 haplotypes in the parental populations.

3. Results

Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were not detected in the distribution of HLA alleles. In this study, 19 HLA-A, 43 HLA-B, 14 HLA-DRB1 and 7 HLA-DQB1 alleles were found. The most frequent HLA-A alleles were HLA-A*02, -A*24, and -A*68, and the most frequent HLA-B alleles were HLA-B*35, -B*39, and -B*51. The most common alleles of the HLA-DRB1 and DQB1 loci were HLA-DRB1*04, -DRB1*08, -DRB1*07, -DQB1*0302, -DQB1*0301, and -DQB1*0201 (Table 1).

The most frequent HLA-A/-B associations were A*24-B*35, A*24-B*39, and A*24-B*4002. Regarding HLA-B/-DRB1 associations, the most frequent were: B*39-DRB1*04, B*4002-DRB1*04, and B*1402-DRB1*01. HLA-DRB1/-DQB1 associations were all strong. Some frequent three-point association were found: A*02-B*39-DR*04, A*2-B*35-DRB1*04, and A*02-B*35-DRB1*08. (Table 2). The most frequent HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1 haplotypes were A*02-B*39-DRB1*04-DQB1*0302 (h.f. = 0.022), A*02-B*35-DRB1*04-DQB1*0302 (h.f. = 0.016), A*68-B*39-DRB1*04-DQB1*0302 (h.f. = 0.014), and A*02-B*35-DRB1*08-DQB1*04 (h.f. = 0.014) (Table 3). The haplotypes in Mexicans divided by geographical region (Mexico City: central area; Puebla State: central area; and Sinaloa State: north area) are shown in Table 4. HLA-A*02, B*39, DRB1*04, DQB1*0302 and HLA-A*68, B*39,

Table 1
Frequencies (g.f.) of HLA-A, -B, -DRB1 and -DQB1 in 381 Mexicans

HLA-A	n	g.f.	HLA-B	n	g.f.	HLA-DRB1	n	g.f.	HLA-DQB1	n	g.f.
A*02	246	0.322	B*35	128	0.168	*04	196	0.257	*0302	181	0.237
A*24	125	0.164	B*39	78	0.102	*08	93	0.122	*0301	158	0.207
A*68	88	0.115	B*51	60	0.078	*07	69	0.090	*0201	124	0.162
A*01	45	0.059	B*61	58	0.076	*14	67	0.087	*0501/02	107	0.140
A*31	45	0.059	B*44	52	0.068	*13	66	0.086	*04	93	0.122
A*03	28	0.036	B*65	37	0.048	*01	62	0.081	*0601/02	88	0.115
A*30	28	0.036	B*62	36	0.047	*17	54	0.070	*0303	11	0.014
A*11	26	0.034	B*08	28	0.036	*11	46	0.060			
A*29	24	0.031	B*07	26	0.034	*15	45	0.059			
A*26	23	0.030	B*18	25	0.032	*16	38	0.049			
A*33	21	0.027	B*49	17	0.022	*10	12	0.015			
A*23	19	0.024	B*38	16	0.021	*09	7	0.009			
A*32	12	0.015	B*48	16	0.021	*12	6	0.007			
A*25	10	0.013	B*41	15	0.019	*18	1	0.001			
A*66	7	0.009	B*15	14	0.018						
A*34	4	0.005	B*57	14	0.018						
A*74	4	0.005	B*52	13	0.017						
A*69	3	0.003	B*53	12	0.015						
A*36	2	0.002	B*13	11	0.014						
AX	2	0.002	B*27	10	0.013						
			B*60	10	0.013						
			B*45	9	0.011						
			B*64	9	0.011						
			B*58	8	0.010						
			B*37	8	0.010						
			B*50	7	0.009						
			B*55	6	0.007						
			B*4005	6	0.007						
			B*63	5	0.006						
			B*42	4	0.005						
			B*75	3	0.003						
			B*71	3	0.003						
			B*70	2	0.002						
			B*56	2	0.002						
			B*67	2	0.002						
			B*78	2	0.002						
			B*81	2	0.002						
			BX	2	0.002						
			B*54	1	0.001						
			B*4013	1	0.001						
			B*4014	1	0.001						
			B*47	1	0.001						
			B*72	1	0.001						
			B*73	1	0.001						

Please cite this article in press as: Barquera, R., et al., HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico, Mol. Immunol. (2007), doi:10.1016/j.molimm.2007.07.042

Table 2
Common HLA associations present in the current study and other populations

Association	h.f.	Δ'	E	AsA	AA	HA	Am
HLA-A/B							
*24/*35	0.0472	0.1428	■		■	■	■
*24/*39	0.0301	0.1551				■	■
*24/*4002	0.0236	0.1674				■	■
*68/*4002	0.0170	0.1185				■	■
*29/*44	0.0170	0.5081	■			■	
*33/*1402	0.0144	0.4995	■			■	
*01/*08	0.0144	0.3547	■		■	■	
*31/*51	0.0131	0.1624					■
HLA-B/DRB1							
*39/*04	0.0538	0.3613				■	■
*4002/*04	0.0393	0.3382				■	■
*1402/*01	0.0341	0.6763	■			■	
*44/*07	0.0314	0.4070	■			■	
*08/*0301	0.0223	0.5771	■		■	■	
*39/*16	0.0144	0.2084				■	
*44/*01	0.0144	0.1417				■	
*07/*15	0.0144	0.3868	■			■	
*18/*0301	0.0118	0.3111	■				
HLA-DRB1/DQB1							
*04/*0302	0.2335	0.9776	■			■	■
*08/*04	0.1141	0.9265					■
*07/*02	0.0813	0.8635	■		■	■	
*01/*05	0.0787	0.9624	■	■		■	
*0301/*02	0.0682	0.9557	■		■	■	
*1402/*0301	0.0603	0.6183	■				■
*15/*06	0.0538	0.8995	■	■	■	■	
*13/*06	0.0524	0.5546	■			■	
*11/*0301	0.0511	0.8083	■	■		■	
*16/*0301	0.0380	0.7017					■
HLA-A/B/DRB1							
*02/*39/*04	0.022	0.8898					■
*02/*35/*04	0.016	0.2113				■	■
*02/*35/*08	0.014	0.6422				■	■
*68/*39/*04	0.014	0.8412				■	■
*24/*35/*04	0.013	0.0727					■
*33/*1402/*01	0.013	1.0000	■				■
*02/*4002/*04	0.012	0.4724					■
*68/*35/*04	0.012	0.5009					■
*29/*44/*07	0.011	0.7998	■			■	
*01/*08/*0301	0.011	0.8437	■		■	■	
*24/*39/*04	0.011	0.2737					■
*02/*1501/*04	0.011	0.7873	■				
*68/*4002/*04	0.011	0.5590					■
*24/*35/*16	0.011	0.7309					■

E: European, AsA: Asian American, AA: African American, HA: Hispanic American, Am: Amerindian. Only the haplotypes with a frequency >1% are shown; h.f. = haplotype frequency; Δ' = standardized delta value.

DRB1*04, DQB1*0302 haplotypes were common in Mexico City population. HLA-A*02, B*35, DRB1*08, DQB1*04; HLA-A*02, B*39, DRB1*16, DQB1*0301 and HLA-A*02, B*39, DRB1*04, DQB1*0302 haplotypes were the most common in the State of Puebla. As expected, in Sinaloa State, the population showed a greater frequency of European haplotypes such as HLA-A*33, B*1402, DRB1*01, DQB1*05 and HLA-A*02, B*1501, DRB1*04, DQB1*0302.

The admixture estimates obtained by the maximum likelihood method, revealed a greater European genetic contribution in Sinaloa (59.6%), when compared to Puebla and Mexico

City's where a higher proportion of Amerindian component was found (56.2% and 50.2%, respectively) (Fig. 1B). With the maximum likelihood method, estimation of the African component was 14% in the studied populations. The analysis based on the frequency of ethnic-specific HLA-A-B-DRB1-DQB1 haplotypes demonstrated the existence of 27.7% of Amerindian, 16.6% of European, 3.5% of African and 52.0% of Mexican Admixed haplotypes in Puebla; 13.3% of Amerindian, 25.8% of European, 2.6% of African, and 58.0% of Mexican admixed haplotypes in Sinaloa; and 22.7% of Amerindian, 14.0% of European, 4.9% of African, and 58.2%

Table 3
HLA-A, B, DRB1, DQB1 haplotype frequencies in 381 Mexicans

Haplotype				N = 762			Previously reported in: population, frequency (author, year)
				n	h.f.	Δ'	
A*02	B*39	DRB1*04	DQB1*0302	17	0.022	0.9759	Mazatecans, 0.108 (Armaiz-Villena et al., 2000); Mayans, 0.042 (Gomez-Casado et al., 2003); Terena (Lazaro et al., 1999)
A*02	B*35	DRB1*04	DQB1*0302	12	0.016	0.3151	Mayans, 0.106 (Gomez-Casado et al., 2003); Mazatecans, 0.025 (Armaiz-Villena et al., 2000); Nahuas, 0.020 (Vargas-Alarcon et al., 2007)
A*68	B*39	DRB1*04	DQB1*0302	11	0.014	0.8700	Mayans, 0.064 (Gomez-Casado et al., 2003)
A*02	B*35	DRB1*08	DQB1*04	11	0.014	0.6749	Aymaras, 0.104; Quechuans, 0.065 (Armaiz-Villena et al., 2005); Nahuas, 0.061 (Vargas-Alarcon et al., 2007); Peruvians, 0.096 (de Pablo et al., 2000); Mayans, 0.084 (Gomez-Casado et al., 2003)
A*33	B*1402	DRB1*01	DQB1*05	10	0.013	1.0000	Murcians, 0.016 (Muro et al., 2001); Mediterraneans (Armaiz-Villena et al., 2003), Spaniards, 0.019 (Sanchez-Velasco et al., 2003); Tunisians, 0.040 (Ayed et al., 2004)
A*24	B*35	DRB1*04	DQB1*0302	10	0.013	0.1656	Mazatecans, 0.025 (Armaiz-Villena et al., 2000), Aymaras, 0.031; Quechuans, 0.014 (Armaiz-Villena et al., 2005)
A*02	B*4002	DRB1*04	DQB1*0302	9	0.012	0.5206	Aymaras, 0.023; Mayans, 0.007 (Armaiz-Villena et al., 2005)
A*68	B*35	DRB1*04	DQB1*0302	9	0.012	0.5464	Mayans, 0.023 (Gomez-Casado et al., 2003); Aymaras, 0.039 (Armaiz-Villena et al., 2005), Nahuas, 0.020 (Vargas-Alarcon et al., 2007)
A*68	B*4002	DRB1*04	DQB1*0302	8	0.011	0.5913	Teenek, 0.029 (Vargas-Alarcon et al., 2006), Terena (Lazaro et al., 1999), Eskimos (Grahovac et al., 1998)
A*24	B*35	DRB1*16	DQB1*0301	8	0.011	0.7757	Zapotec, Mixtec (Hollenback et al., 2001)
A*29	B*44	DRB1*07	DQB1*02	8	0.011	0.8102	Catalans (Comas et al., 1998); Tunisians, 0.040 (Ayed et al., 2004); Murcians, 0.052 (Muro et al., 2001); Basques, 0.075 (Sanchez-Velasco et al., 2003)
A*01	B*08	DRB1*0301	DQB1*02	8	0.011	0.8442	Murcians, 0.024 (Muro et al., 2001); Peruvians, 0.017 (de Pablo et al., 2000)
A*24	B*39	DRB1*04	DQB1*0302	8	0.011	0.3329	Mazatecans, 0.033 (Armaiz-Villena et al., 2000)
A*02	B*1501	DRB1*04	DQB1*0302	8	0.011	0.4621	Murcians, 0.016 (Muro et al., 2001)
A*02	B*1501	DRB1*08	DQB1*04	7	0.009	0.5313	Admixed, this study
A*02	B*39	DRB1*08	DQB1*04	7	0.009	0.3292	Aymaras, 0.034 (Armaiz-Villena et al., 2005)
A*02	B*44	DRB1*07	DQB1*02	7	0.009	0.6236	Murcians, 0.016 (Muro et al., 2001); Spaniards, 0.019 (Sanchez-Velasco et al., 2003); Tunisians, 0.030 (Ayed et al., 2004)
A*02	B*51	DRB1*08	DQB1*04	6	0.008	0.2955	Admixed, this study
A*24	B*4002	DRB1*04	DQB1*0302	6	0.008	0.2092	Nahuas, 0.034; Mixtecans, 0.030 (Vargas-Alarcon et al., 2007); Bari, 0.344 (Layrisse et al., 1995)
A*02	B*51	DRB1*11	DQB1*0301	6	0.008	0.5045	Portuguese, 0.053 (Spinola et al., 2002)
A*24	B*35	DRB1*11	DQB1*0301	6	0.008	0.4705	Central Europeans (Armaiz-Villena et al., 2003)
A*24	B*39	DRB1*14	DQB1*0301	6	0.008	0.5208	Nahuas, 0.054 (Vargas-Alarcon et al., 2007)
A*02	B*39	DRB1*16	DQB1*0301	5	0.007	0.4469	Mazatecans, 0.033 (Armaiz-Villena et al., 2000)
A*31	B*51	DRB1*04	DQB1*0302	5	0.007	0.3317	Portuguese, 0.053 (Spinola et al., 2002)
A*31	B*35	DRB1*08	DQB1*04	5	0.007	0.4259	Admixed, this study
A*30	B*13	DRB1*07	DQB1*02	5	0.007	0.5181	Euroasiatics (Armaiz-Villena et al., 2003); Northern China, 0.031 (Yang et al., 2006)
A*24	B*35	DRB1*14	DQB1*0301	5	0.007	0.3497	Aymaras, 0.028; Quechuans, 0.014 (Armaiz-Villena et al., 2005)
A*02	B*51	DRB1*01	DQB1*05	4	0.005	0.1602	Admixed, this study
A*03	B*07	DRB1*15	DQB1*06	4	0.005	0.3977	Basques, 0.025; Spaniards, 0.011 (Sanchez-Velasco et al., 2003)
A*02	B*1402	DRB1*01	DQB1*05	4	0.005	0.3518	Admixed, this study
A*02	B*44	DRB1*01	DQB1*05	4	0.005	0.2908	Admixed, this study
A*24	B*48	DRB1*04	DQB1*0302	4	0.005	0.2406	Admixed, this study
A*24	B*4002	DRB1*08	DQB1*04	4	0.005	0.1941	Admixed, this study
A*03	B*08	DRB1*0301	DQB1*02	4	0.005	0.3837	Admixed, this study
A*68	B*35	DRB1*08	DQB1*04	4	0.005	0.1941	Admixed, this study
Others				463	<0.003		

h.f. = haplotype frequency; Δ' = standardized delta value.

Please cite this article in press as: Barquera, R., et al., HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico, Mol. Immunol. (2007), doi:10.1016/j.molimm.2007.07.042

Table 4
Proposed origin of the most frequent HLA-A, B, DRB1, DQB1 haplotypes found in the three populations of our study^a

A	B	DRB1	DQB1	h.f.	Δ'	Am	E	AA
Mexico City								
*02	*39	*04	*0302	0.0289	1.0000	■		
*68	*39	*04	*0302	0.0248	0.8952	■		
*24	*35	*04	*0302	0.0165	0.1240	■		
*24	*35	*16	*0301	0.0165	0.6833	■		
*02	*4002	*04	*0302	0.0124	0.2762	■		
*02	*1402	*01	*05	0.0124	0.4873		■	
*01	*08	*0301	*02	0.0124	0.5417		■	
*02	*35	*08	*04	0.0124	0.2667	■		
*31	*35	*04	*0302	0.0124	0.1906	■		
*31	*35	*08	*04	0.0124	0.3905			■
Puebla State								
*02	*35	*08	*04	0.0303	0.8141	■		
*02	*39	*16	*0301	0.0253	1.0000	■		
*02	*39	*04	*0302	0.0253	0.5075	■		
*24	*4002	*04	*0302	0.0202	0.5729	■		
*68	*35	*04	*0302	0.0202	0.5729	■		
*24	*35	*04	*0302	0.0152	0.3869	■		
*24	*35	*16	*0301	0.0152	0.6080	■		
*02	*51	*08	*04	0.0152	0.3869		■	
*02	*1501	*04	*0302	0.0152	0.3793		■	
*02	*1501	*08	*04	0.0152	0.4321			■
Sinaloa State								
*24	*39	*04	*0302	0.0268	1.0000	■		
*02	*1501	*04	*0302	0.0179	0.7275		■	
*31	*51	*04	*0302	0.0179	0.7275		■	
*03	*08	*0301	*0301	0.0179	0.8483		■	
*33	*1402	*01	*05	0.0179	0.7718		■	
*02	*51	*11	*0301	0.0179	0.7960		■	
*02	*39	*04	*0302	0.0179	0.5502	■		
*24	*35	*11	*0301	0.0179	0.8322		■	
*26	*27	*15	*06	0.0179	0.8080			■
*68	*4002	*04	*0302	0.0179	0.7275	■		

E: European, AA: African American, Am: Amerindian. Only the haplotypes with a frequency > 1% are shown; h.f. = haplotype frequency; Δ' = standardized delta value.

^a Please see Yunis et al. (2003) for referred haplotypes.

of Mexican admixed haplotypes in Mexico City (data not shown).

4. Discussion

This study reports a greater number of HLA-A and HLA-B generic alleles when compared against to previous reports (Weckmann et al., 1997). This may be due to the sample size and/or the diversity of the geographic origins of the individuals studied. The analysis, as we expected, showed high frequencies of Amerindian and low frequencies of European and African alleles. In addition, one of the aims of our study was to compare the allele and haplotype frequencies in Admixed Mexicans with those reported in other ethnic groups. In this context, the most common HLA-A alleles in Mexicans (HLA-A*02, -A*24, and -A*68) are also common in Mexican, Central and South-American Amerindian populations (Vargas-Alarcon et al., 2006; Gomez-Casado et al., 2003; Arnaiz-Villena et al., 2005). On the other hand, the most frequent HLA-B alleles were -B*35, -B*39, and -B*61, which are also alleles of Amerindian popu-

lations (Arnaiz-Villena et al., 2000; Arnaiz-Villena et al., 2005; Vargas-Alarcon et al., 2003). Another two frequent alleles in our study, HLA-B*51 and -B*44, are also frequent in Europeans (Muro et al., 2001; Sanchez-Velasco et al., 2003). Regarding the HLA class II, HLA-DRB1*04, *08, and -*07 alleles were the most common. HLA-DRB1*04 and *08 alleles are markers of Amerindian populations (Arnaiz-Villena et al., 2000; Arnaiz-Villena et al., 2005; Vargas-Alarcon et al., 2007). Previous studies have demonstrated that DRB1*0407 is the most common subtype of DRB1*04 in Mexicans (Vargas-Alarcon et al., 2000). The HLA-DRB1*07 allele is frequent in Europeans, mainly northern-Spaniard populations (Sanchez-Velasco et al., 2003; Muro et al., 2001). The most frequent HLA-DQB1 alleles in our population were *0302, *0301 and *0201. The first two alleles have been reported in Amerindian populations (Arnaiz-Villena et al., 2000; Vargas-Alarcon et al., 2006), whereas HLA-DQB1*0201 is frequent in Europeans (Sanchez-Velasco et al., 2003).

In relation to HLA-A/-B and HLA-B/-DRB1 blocks, the most common associations were HLA-A*24/-B*35, -A*24/-B*39,

-A*24/-B*4002; HLA-B*39/-DRB1*04, -B*4002/-DRB1*04, and -B*1402/-DRB1*01. The associations of DRB1/-DQB1 showed the greatest diversity in relation to the previous blocks, the most common were HLA-DRB1*04/-DQB1*0302, -DRB1*08/-DQB1*04, and -DRB1*07/-DQB1*02 with higher LD delta values (see Table 2). The HLA-DRB1*14/-DQB1*0301 association is present in several Amerindian populations (Vargas-Alarcon et al., 2006).

The four most common HLA-A-B-DRB1-DQB1 haplotypes found in our study involve those haplotypes previously reported in Amerindian populations, which is in agreement with the historical, and therefore, genetic composition of the admixed Mexican, showing that people of Mexico have an important Amerindian component. Native American populations have been in contact with Mexican Mestizos with few restrictions, giving possibility to admixture and preserving the ancestral Amerindian genes, as can be shown by our data. In spite of this, some of the haplotypes found to be frequent in this sample have been reported in European populations, showing the European contribution to the present genetic diversity.

The contribution of European haplotypes to the genetic constitution of Sinaloa is clear, since half of the most common haplotypes found in this population have a proposed European origin. The estimations of Amerindian genetic contribution in Mexico City and Puebla were near 50%. In the case of Sinaloa, this is the first admixture estimation ever done in this population, and it is consistent with the increased European genetic contribution trends in the northern part of Mexico. These geographic regions have been shown to contain a greater proportion of Amerindian and European alleles than African by other authors when comparing the contribution of each parental population with classical markers (Lisker et al., 1986; Lisker et al., 1988; Cerda-Flores et al., 2002), an observation that remains consistent with this study's results. Even if this is so, a greater African genetic contribution was estimated (calculated by the maximum likelihood method) in comparison with these reference studies. This may be explained by the fact that HLA-B is a genetic marker with globally distributed alleles, showing frequency disparities only in a few alleles, with the implicit possibility of sharing alleles with African populations not necessarily acquired from this continent's immigrants. In contrast with the admixture estimates obtained by the maximum likelihood method, the analysis based on the frequency of ethnic-specific HLA-A-B-DRB1-DQB1 haplotypes demonstrated that the proportion of African haplotypes in Mexican population was less than 6% in the three regions (Mexico City, Puebla and Sinaloa). This is consistent with our results of admixture estimations using STR markers in another Mexican Mestizo population (unpublished data) in which we observed a proportion of 7% of African genes.

In summary the present study shown that Mexicans from Sinaloa State (North area of Mexico) have a greater proportion of European genetic component compared with Mexicans from the Central area, which have a greater percentage of Amerindian genes and haplotype diversity. Our results are important for future comparative genetic studies of different Mexican ethnic groups, and should be helpful for evolution, HLA-disease association and transplantation studies.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico D.F., Mexico. The authors are grateful to the study participants.

References

- Ahmad, T., Neville, M., Marshall, S.E., Armuzzi, A., Mulcahy-Hawes, K., Crawshaw, J., Sato, H., Ling, K.L., Barnardo, M., Goldthorpe, S., Walton, R., Bunce, M., Jewell, D.P., Welsh, K.I., 2003. Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC. *Hum. Mol. Gen.* 12, 647–656.
- Arnaiz-Villena, A., Vargas-Alarcon, G., Granados, J., Gomez-Casado, E., Longas, J., Gonzales-Hevilla, M., Zuniga, J., Salgado, N., Hernandez-Pacheco, G., Guillen, J., Martinez-Laso, J., 2000. HLA alleles in Mexican Mazatecos, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 56, 405–416.
- Arnaiz-Villena, A., Martinez-Laso, J., Moscoso, J., Livshits, G., Zamora, J., Gomez-Casado, E., Silvera-Redondo, C., Melvin, K., Crawford, M.H., 2003. HLA genes in the Chuvashian population from European Russia: Admixture of central European and Mediterranean populations. *Hum. Biol.* 75, 375–392.
- Arnaiz-Villena, A., Siles, N., Moscoso, J., Zamora, J., Serrano-Vela, J.I., Gomez-Casado, E., Castro, M.J., Martinez-Laso, J., 2005. Origin of Aymaras from Bolivia and their relationship with other Amerindians according to HLA genes. *Tissue Antigens* 65, 379–390.
- Ayed, K., Ayed, J.S., Sfar, J., Labonne, M., Gebuhrer, L., 2004. HLA class I and HLA class II phenotypic, gene and haplotypic frequencies in Tunisians by using molecular typing data. *Tissue Antigens* 64, 520–532.
- Cao, K., Hollenbach, J., Shi, X., Shi, W., Chopek, M., Fernandez-Vina, M., 2001. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum. Immunol.* 62, 1009–1030.
- Cerda-Flores, R., Jin, L., Barton, S., Deka, R., Chakraborty, R., 2002. Maximum likelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am. J. Hum. Biol.* 14, 429–439.
- Chakraborty, R., 1986. Gene admixture in human populations: models and predictions. *Yearb. Phys. Anthropol.* 29, 1–43.
- Comas, D., Mateu, E., Calafell, F., Perez-Lezaun, A., Bosch, E., Martinez-Arias, R., Bertranpeti, J., 1998. HLA class I and class II DNA typing and the origin of Basques. *Tissue Antigens* 51, 30–40.
- de Pablo, R., Beraun, Y., Nieto, A., Calzada, J.E., Rementería, M.C., Sanz, L., Lopez-Nevot, M.A., Martin, J., 2000. HLA class I and class II allele distribution on the Peruvian population. *Tissue Antigens* 56, 507–514.
- Gomez-Casado, E., Martinez-Laso, J., Moscoso, J., Zamora, J., Martin-Villa, M., Perez-Bias, M., Lopez-Santalla, M., Lucas-Gramajo, P., Silvera, C., Lowy, E., Arnaiz-Villena, A., 2003. Origin of Mayans according to HLA genes and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 61, 425–436.
- Grahovac, B., Sukernik, R.I., O'Luigin, C., Zaleska-Rutczynska, Z., Blagitko, N., Raldugina, O., Kosutic, T., Satta, Y., Figueroa, F., Takahata, N., Klein, J., 1998. Polymorphism of the HLA class II loci in Siberian populations. *Hum. Genet.* 102, 27–43.
- Hammond, M.G., Du Toit, E.D., Sanchez-Mazas, A., Andrien, M., Coluzzi, M., De Pablo, M.R., De Stefano, G., Kaplan, C., Kennedy, L., Louie, L., Migot, F., 1997. HLA in sub-Saharan Africa. In: Charron, D. (Ed.), *Genetic Diversity of HLA: Functional and Medical Implication*. 12th International Histocompatibility Workshop. EDK, Sevres France, pp. 345–353.
- Hollenbach, J.A., Thomson, G., Cao, K., Fernández-Viña, M., Erlich, H.A., Bugawan, T.L., Winkler, C., Winter, M., Klitz, W., 2001. HLA diversity, differentiation, and haplotype evolution in Mexican Natives. *Hum. Immunol.* 62, 378–390.
- Layrisse, Z., Guedez, Y., Dominguez, E., Herrera, F., Soto, M., Balbas, O., Matos, M., Alfonso, J.C., Granados, J., Scorza, J., 1995. Extended HLA haplotypes among the Bari Amerindians of the Perija range. Relationship to

- other tribes based on four-loci haplotype frequencies. *Hum. Immunol.* 44, 228–235.
- Lazaro, A.M., Moraes, M.E., Marcos, C.Y., Moraes, J.R., Fernandez-Vina, M.A., Stastny, P., 1999. Evolution of HLA-class I compared to HLA-class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe. *Hum. Immunol.* 60, 1138–1149.
- Lisker, R., Perez-Briceno, R., Granados, J., Babinsky, V., de Rubens, J., Armendarces, S., Buentello, L., 1986. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am. J. Phys. Anthropol.* 71, 203–207.
- Lisker, R., Perez-Briceno, R., Granados, J., Babinsky, V., 1988. Gene frequencies and admixture estimates in the State of Puebla, Mexico. *Am. J. Phys. Anthropol.* 76, 331–335.
- Muro, M., Marin, L., Torio, A., Moya-Quijes, M.R., Minguela, A., Rosique-Roman, J., Sanchis, M.J., Garcia-Calatayud, M.C., Garcia-Alonso, A.M., Alvarez-Lopez, M.R., 2001. HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): In the cradle of the archaeological Iberians. *Hum. Immunol.* 62, 910–921.
- Prugnolle, F., Manica, A., Charpentier, M., Guégan, J.F., Guemier, V., Balloux, F., 2005. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr. Biol.* 15, 1022–1027.
- Sanchez-Velasco, P., Gomez-Casado, E., Martinez-Laso, J., Moscoso, J., Zamora, J., Lowy, E., Silvera, C., Combarain, A., Leyva-Cobian, F., Arnaiz-Villena, A., 2003. HLA alleles in isolated populations from North Spain: Origin of the Basques and the ancient Iberians. *Tissue Antigens* 61, 384–392.
- Spinola, H., Brehm, A., Williams, F., Jesus, J., Middleton, D., 2002. Distribution of HLA alleles in Portugal and Cabo Verde: relationships with the slave trade route. *Am. Hum. Genet.* 66, 285–296.
- Vargas-Alarcon, G., Gamboa, R., Zuniga, J., Hernandez-Pacheco, G., Ramos-Kuri, M., Castillo, E., Gomez-Casado, E., Martinez-Laso, J., Arnaiz-Villena, A., Granados, J., 2000. HLA-DR4 allele frequencies on Indian and Mestizo population from Mexico. *Hum. Immunol.* 61, 341–344.
- Vargas-Alarcon, G., Hernandez-Pacheco, G., Zuniga, J., Rodriguez-Perez, J.M., Perez-Hernandez, N., Rangel, C., Villarreal-Garza, C., Martinez-Laso, J., Granados, J., Arnaiz-Villena, A., 2003. HLA-B alleles distribution in Mexican Amerindians. *Immunogenetics* 54, 756–760.
- Vargas-Alarcon, G., Hernandez-Pacheco, G., Moscoso, J., Perez-Hernandez, N., Murguía, L.E., Moreno, A., Serrano-Vela, J.I., Granados, J., Arnaiz-Villena, A., 2006. HLA genes in Mexican Teeneks: HLA genetic relationship with other worldwide populations. *Mol. Immunol.* 43, 790–799.
- Vargas-Alarcon, G., Moscoso, J., Martinez-Laso, J., Rodriguez-Perez, J.M., Flores-Dominguez, C., Serrano-Vela, J.I., Moreno, A., Granados, J., Arnaiz-Villena, A., 2007. Origin of Mexican Nahuas (Aztec) according to HLA genes and their relationship with worldwide populations. *Mol. Immunol.* 44, 747–755.
- Wang, J., 2003. Maximum likelihood estimation of admixture proportions from genetic data. *Genetics* 164, 747–765.
- Weckmann, A.L., Vargas-Alarcón, G., López, M., Gonzalez, N., De Leo, C., Castelan, N., Bordes, J., Alarcón-Segovia, D., Granados, J., Ramirez, E., Lisker, R., 1997. Frequencies of HLA-A and HLA-B alleles in a Mexico City mestizo sample. *Am. J. Hum. Biol.* 9, 1–5.
- Yang, G., Deng, Y.J., Hu, S.N., Wu, D.Y., Li, S.B., Zhu, J., Zhu, B.F., Liu, Y., 2006. HLA-A, -B, and -DRB1 polymorphism defined by sequence based typing of the Han population in Northern China. *Tissue Antigens* 67, 146–152.
- Yunis, E.J., Larsen, C.E., Fernandez-Viña, M., Awdeh, Z.L., Romero, T., Hansen, J.A., Alper, C.A., 2003. Inheritable variable sizes of DNA stretches in human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. *Tissue Antigens* 62, 1–20.
- Yunis, E.J., Zúñiga, J., Larsen, C.E., Fernández-Viña, M., Granados, J., Awdeh, Z.L., Alper, C.A., 2005. Single Nucleotide Polymorphism blocks and haplotypes: Human MHC block diversity. In: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, vol. 13, second ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, DE, pp. 191–215.