



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

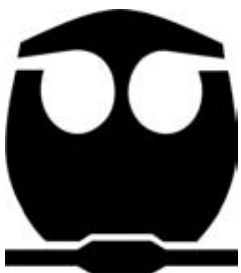
HAPLOTIPOS EXTENDIDOS CONSERVADOS DEL SISTEMA HLA CLASE I Y CLASE II Y
SUS FRAGMENTOS O BLOQUES EN MEXICANOS: IMPLICACIONES PARA EL ESTUDIO DE
LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES MESTIZAS.

ACTIVIDAD DE
INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOSÉ RODRIGO BARQUERA LOZANO



MÉXICO, DF.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

VOCAL: Profesor: Enrique Ortega Soto

SECRETARIO: Profesor: Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos

1er SUPLENTE: Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría

2° SUPLENTE: Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Inmunobiología y Genética, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), DF, México; Laboratorio de Genética Molecular, Escuela Nacional de Antropología e Historia (ENAH), DF, México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos.

SUSTENTANTE:

José Rodrigo Barquera Lozano.

HAPLOTIPOS EXTENDIDOS CONSERVADOS DEL SISTEMA HLA CLASE I Y CLASE II Y
SUS FRAGMENTOS O BLOQUES EN MEXICANOS: IMPLICACIONES PARA EL ESTUDIO DE
LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES MESTIZAS

CONTENIDO

1.	Introducción	7
1.1.	La importancia del estudio de los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad.	7
1.2.	La génesis del acervo genético de las poblaciones mestizas mexicanas.	12
1.3.	El análisis de la diversidad biológica exhibida por las poblaciones mestizas mexicanas: el caso de la Ciudad de México.	17
2.	Objetivos	19
2.1.	Objetivo general.....	19
2.2.	Objetivos particulares	19
3.	Materiales y Métodos	22
3.1.	Muestra analizada	22
3.2.	Declaración sobre bioética.....	22
3.3.	Tipificación de HLA.....	22
3.4.	Los bloques del sistema HLA y la asignación de haplotipos extendidos conservados (HEC) 23	
3.5.	Cálculos de diversidad genética de la muestra	24
3.6.	Estimaciones de mestizaje en mexicanos con genes HLA como estimadores.....	25
3.7.	Estimaciones de mestizaje en mexicanos mediante el uso de STRs	27
4.	Resultados	29
4.1.	Frecuencias alélicas de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> , <i>-C</i> , <i>-DRB1</i> y <i>-DQB1</i> en individuos mexicanos mestizados.	29
4.2.	Distribución de los bloques <i>HLA-C/-B</i> y <i>-DRB1/-DQB1</i> en individuos mexicanos mestizados.	31
4.3.	Haplotipos HLA extendidos conservados.....	36
4.4.	Extensión de los haplotipos conservados extendidos de HLA al gen <i>HLA-A</i>	38
4.5.	La diversidad genética en el sistema HLA en la muestra de mexicanos.	40

4.6. Los individuos mexicanos mestizados tienen una proporción significativa de componentes genéticos nativo americano y europeo.....	41
5. Discusión	44
6. Conclusiones y Perspectivas.....	52
7. Revisión Bibliográfica	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación de los sitios polimórficos en las moléculas HLA y su correspondiente organización genómica (sólo se muestran los exones). 10	
Figura 2: El análisis de componentes principales (PCA) revela una relación genética cercana de los individuos mexicanos mestizados de la Ciudad de México con los grupos nativos americanos. 42	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Frecuencias alélicas de <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> , <i>-C</i> , <i>-DRB1</i> y <i>-DQB1</i> en 234 mexicanos. 30	
Tabla 2: Frecuencias de los bloques <i>HLA-C/-B</i> en 234 individuos mexicanos (468 haplotipos). 33	
Tabla 3: Frecuencias de bloques <i>HLA-DRB1/-DQB1</i> en 234 individuos mexicanos mixtos (468 haplotipos). 35	
Tabla 4: Haplotipos extendidos conservados del sistema HLA en 234 individuos mexicanos (468 haplotipos). 37	
Tabla 5: Extensión de los haplotipos extendidos conservados del sistema HLA al gen <i>HLA-A</i> en 234 individuos mexicanos (468 haplotipos). 39	
Tabla 6: Medidas de diversidad genética a nivel alélico para el sistema HLA en una población mixta de México. 40	

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La importancia del estudio de los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) se encuentran localizados en la posición cromosómica *Chr* 6p21.3 dentro de una región génica densamente ocupada –cerca de 420 genes-, entre los que se encuentran los genes del sistema de antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigen*, HLA), que son los que exhiben mayor polimorfismo y por tanto, son responsables de las mayores diferencias inmunogenéticas entre individuos de una población y entre poblaciones; de hecho, el polimorfismo es tan grande, que el número teórico de fenotipos posibles que resultan de todas las combinaciones de alelos HLA es más grande que la población humana en la Tierra [Williams 2001]. A cada uno de estos polimorfismos se le conoce como alelos y se heredan en haplotipos. Un haplotipo es un segmento cromosómico que involucra a varios alelos que se hereda en bloque en un gran porcentaje de las ocasiones. Estos bloques se conservan por lo general de generación en generación de manera bastante constante, hasta que en una meiosis determinada los alelos de un haplotipo pueden intercambiarse por los del cromosoma homólogo. Los distintos genes del sistema HLA segregan conjuntamente de una generación a otra con una baja probabilidad de recombinación. Estos bloques, o haplotipos, son definidos únicamente cuando se analiza la herencia de los alelos en familias, y no por inferencia estadística [Yunis *et al.*, 2003; Yunis *et al.*, 2005]. A la herencia conjunta no aleatoria de estos alelos en un bloque se le conoce como desequilibrio de ligamiento (*Linkage Disequilibrium*, LD)

y a la distancia cromosómica dentro de la cual la probabilidad de que un alelo en un locus se separe de otro por entrecruzamiento meiótico –se rompa el LD- es igual a 0,01 se le conoce como centiMorgan (cM). El sistema HLA se extiende a lo largo de 4 millones de bases dentro del cromosoma 6 con una probabilidad de recombinación dentro de la región de 0,04, es decir, posee una medida de recombinación de 4 cM. Los productos de expresión génica de este sistema son glicoproteínas de superficie cuya función consiste en presentar antígenos endógenos (clase I, con las moléculas A, B, C, E, G, codificadas por los genes con el mismo nombre; en esta región genómica también se localizan los pseudogenes *-H, -J, -K y -L*) o exógenos (clase II, representada por los antígenos heterodímeros DM, DP, DQ y DR, codificada por los genes *DMA, DMB, DPA1, DPB1, DQA1, DQB1, DRA, DRB1 a DRB9*). Las variantes en la secuencia genómica –a nivel DNA- y su repercusión en la secuencia de aminoácidos en cada uno de estos genes se denotan en la nomenclatura del sistema. En resumen, las primeras letras designan al sistema genético, después del guión se encuentran la o las letras y números que nombran al gen, delante del asterisco se encuentran los dígitos que indican el grupo serológico al que pertenece el alelo seguido por dos puntos, tras los cuales se colocan los dígitos que señalan la especificidad dentro del grupo –generalmente distinguida de otras por variaciones en al menos un aminoácido de la secuencia-; seguido de dos puntos, se ubican los dígitos que indican la presencia de variaciones sinónimas en la secuencia de DNA de la región codificante del alelo y después de los últimos dos puntos, los dígitos **que identifican variaciones en los intrones o en las regiones 3' y 5'** no traducidas que flanquean los intrones o exones del alelo [Marsh 2010]. Así, tenemos que la secuencia del alelo HLA-A*02:01:01:03 corresponde a la tercera variante en la región no codificante, de la primera variante sinónima del alelo 01 de la determinante serológica 02 del gen A del sistema HLA. Cuando al final de la designación se

añade una letra N (*Null*), se refiere a que el alelo contiene un cambio en la secuencia que impide la expresión de la molécula (generalmente un codón de paro), por lo que el alelo no contribuye al fenotipo de la célula. Si se trata de una letra L (*Low*), significa que contiene cambios que disminuyen la expresión de la variante en la superficie de la célula, mientras que una letra S (*Secreted*) implica que la molécula se secreta y no se encuentra en la superficie celular.

La molécula presentadora de clase I se compone de tres dominios codificados por cada uno de los genes de HLA clase I y de una **molécula adicional: la β 2-microglobulina (*B2M*, Chr 15q21-22)**; en cambio, las moléculas presentadoras de clase II son heterodímeros **formados por una cadena α y una cadena β , la primera de ellas** prácticamente no presenta polimorfismo dentro de la especie, mientras que la segunda concentra gran parte de sus variaciones en la región de unión al péptido (Figura 1). En ambos casos, las dos moléculas requieren ensamblarse (entre ellas y con su péptido a presentar cargado en la hendidura de presentación) dentro del retículo endoplásmico –razón por la que el exón 1 codifica para un péptido señal altamente conservado- antes de expresarse en la superficie; de lo contrario, no pueden mantener su estructura tridimensional estable. Dentro del espectro de péptidos que se pueden presentar a través de la clase I se encuentran péptidos virales y fragmentos de proteínas que son generadas dentro de las células, mientras que los previamente fagocitados y procesados son exhibidos por la clase II. La función de ambas clases se pone en manifiesto en la distribución de sus moléculas en el organismo: la clase I es ubicua, mientras que la distribución de las pertenecientes a la clase II se encuentra restringida a aquellas células especializadas en fagocitar y presentar antígenos en su superficie: células dendríticas (*dendritic cell*, DC), macrófagos y linfocitos B.

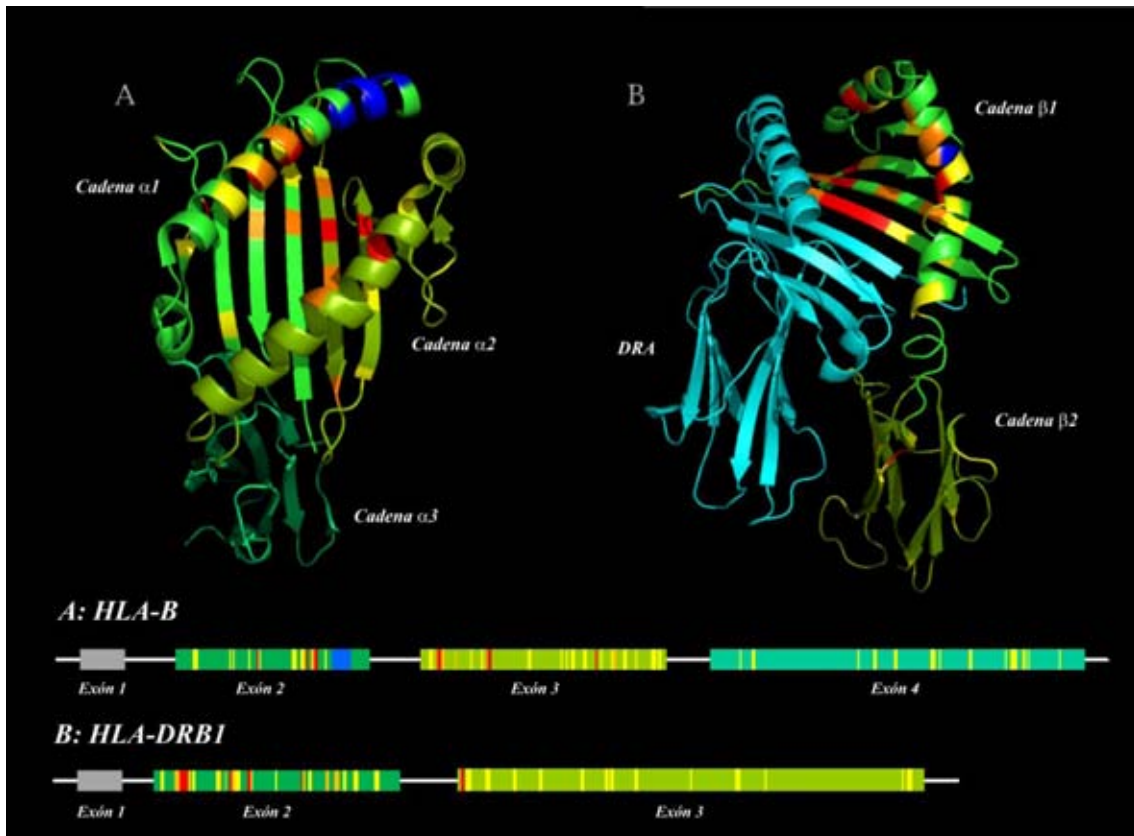


Figura 1: Representación de los sitios polimórficos en las moléculas HLA y su correspondiente organización genómica (sólo se muestran los exones).

A) Representación de una molécula HLA-B (a partir del archivo PDB 2RFX para el alelo HLA-B*57:01); **B)** Representación de una molécula HLA-DR (a partir del archivo PDB 1AQD para el alelo HLA-DRB1*01:01). Guía de colores: En distintos tonos de verde se señalan las posiciones conservadas (un solo residuo de aminoácido), ■ Exón correspondiente al péptido señal (no presente en la molécula presentadora madura), ■ Posición con dos posibles aminoácidos, ■ Posición con tres posibles aminoácidos, ■ Posición con cuatro o más posibles aminoácidos; en **A)**, ■ señala la región que distingue a los grupos Bw4/Bw6, ■ señala la cadena $\alpha 1$, ■ señala la cadena $\alpha 2$, ■ señala la cadena $\alpha 3$; en **B)**, ■ señala el residuo 72, parte del denominado epítipo reumatoide, ■ señala la cadena $\beta 1$, ■ señala la cadena $\beta 2$, ■ Cadena DRA (no polimórfica). Se analizaron las secuencias de aminoácidos de 50 alelos de HLA-B (HLA-B*07:02, -B*08:01, -B*13:01, -B*14:01, -B*14:02, -B*15:01, -B*15:02, -B*15:03, -B*15:04, -B*18:01, -B*27:01, -B*27:05, -B*35:01, -B*35:02, -B*37:01, -B*38:01, -B*39:01, -B*39:02, -B*39:06, -B*40:01, -B*40:02, -B*40:05, -B*07:02, -B*41:01, -B*42:01, -B*44:02, -B*45:01, -B*46:01, -B*47:01, -B*48:01, -B*49:01, -B*50:01, -B*51:01, -B*51:02, -B*52:01, -B*52:02, -B*53:01, -B*54:01, -B*55:01, -B*56:01, -B*57:01, -B*57:05, -B*58:01, -B*59:01, -B*67:01, -B*73:01, -B*78:01, -B*81:01, -B*82:01, -B*83:01) y 22 alelos de HLA-DRB1 (HLA-DRB1*01:01, -DRB1*03:01, -DRB1*03:02, -DRB1*04:01, -DRB1*04:05, -DRB1*04:07, -DRB1*07:01, -DRB1*08:01, -DRB1*08:02, -DRB1*09:01, -DRB1*10:01, -DRB1*11:01, -DRB1*11:02, -DRB1*12:01, -DRB1*13:01, -DRB1*13:02, -DRB1*14:01, -DRB1*14:02, -DRB1*14:06, -DRB1*15:01, -DRB1*16:01, -DRB1*16:02) [Robinson 2003]. Las moléculas fueron editadas con el programa *PyMOL* [PyMOL Molecular Graphics System]. Los sitios genómicos no están representados a escala. Tomado de Barquera R, 2012.

Ambas clases son reconocidas por los linfocitos T: los complejos HLA clase I/péptido por los linfocitos T CD8+ circulantes y los complejos HLA clase II/péptido por los linfocitos T CD4+ en los ganglios linfáticos preferentemente. Dentro de la clase I, dos grandes familias se distinguen de cada uno de sus dos genes principales: los alelos del gen HLA-B pertenecen a una de dos familias denominadas Bw4 o Bw6 de acuerdo con la secuencia de residuos de aminoácidos entre las posiciones 77 y 83 de estas proteínas (figura 1); y los grupos C1 y C2 en los que se clasifican los alelos del gen HLA-C en base a dos posiciones específicas: el residuo 77 (S o N) y el residuo 80 (N o K).

Dado que la mortalidad se encuentra parcialmente en función de las epidemias infecciosas y se ha asociado fuertemente a ella aún cuando intervienen durante periodos relativamente cortos en la historia humana, cualquier cambio heredable que pueda afectar la resistencia a la infección por patógenos se espera que esté sometido a selección natural en cierto grado [Novembre y Han, 2012]. Todo cuanto antecede implica que el sistema HLA está sujeto a presión selectiva y, dado que cada población se encuentra sometida a distintos retos inmunes, es de esperar que el sistema presente una marcada variación geográfica y una elevada variabilidad producto de la conversión génica interalélica. Tal es el argumento para su utilización como marcadores de ancestría probable en los grupos humanos, sin olvidar que existen marcadores poblacionales específicamente diseñados para contar con una mejor aproximación en el estudio de los movimientos migratorios humanos [Salzano, 2002; Fernández-Viña *et al.*, 2012].

Una de las contrapartes fisiológicas del sistema HLA se encuentra expresado en las células *Natural Killer* (NK) y se conoce como receptores tipo inmunoglobulina de células NK (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*, KIRs, Chr 19q13.4) y la evidencia apunta a que parte de la diversidad exhibida en este sistema

correlaciona con la selección alélica y haplotípica sufrida por el HLA y por tanto, esta relación HLA/KIR influye en el curso de diferentes condiciones clínicas [Torres 2008]. El sistema HLA funciona como regulador de activación o inhibición de la actividad citotóxica de las células NK mediante la variación en la expresión de proteínas HLA de clase I en la superficie celular, particularmente en células infectadas, tumorales y alogénicas [Vansan 2008].

El estudio de esta relación dentro del sistema inmune ha adquirido relevancia al observarse mayor incidencia de GVHD en individuos receptores de trasplante de médula ósea de donadores HLA-idénticos de los que difieren en el genotipo KIR, en particular entre los genes KIR3DL1 y KIR3DS1. La combinación KIR3DL1/Bw4 se ha asociado a menor mortalidad y la presencia de KIR2DS3 es factor de protección en el desarrollo de GVHD. Por otro lado, cuando KIR2DS5 se encuentra en el receptor o en ambos integrantes de la pareja, existe mayor riesgo de recaída. Es evidente que mayor conocimiento en la genética y biología de este sistema aportará mayores beneficios al paciente, pues se arrojará luz sobre el papel de las células NK en la biología del trasplante así como posibles usos terapéuticos de la aloreactividad controlada, en el trasplante de HSTs y en el entendimiento de los procesos de tolerancia en el embarazo [Vansan 2008; Skellekens 2008].

1.2. La génesis del acervo genético de las poblaciones mestizas mexicanas.

Las poblaciones nativas de América descienden de un pequeño número de individuos que llegaron en al parecer tres oleadas migratorias provenientes del Este de Asia hace 15 000 a 18 000 años [Greenberg *et al.*, 1986; Reich *et al.*, 2012]. Una de ellas,

posiblemente la más antigua, dio origen a la mayoría de los grupos indígenas de América y por ende, de México, tras una estadía en la región norte del continente, de la cual posiblemente se haya generado una gran parte de la diversidad genética observada en los grupos nativos de América y que separa a estos linajes de sus precursores asiáticos [Tamm *et al.*, 2007; Reich *et al.*, 2012]. Estos movimientos intercontinentales pusieron en marcha dos mecanismos clave en la genética de poblaciones: el efecto de cuello de botella y el efecto fundador. Ambos favorecen la disminución de la variabilidad biológica, razón por la cual las poblaciones nativas americanas generalmente exhiben niveles de diversidad genética relativamente bajos comparados con otros grupos humanos [Wang 2008]. Empero, existe evidencia de una considerable diferenciación inter poblacional debida a la rápida dispersión de los nuevos migrantes en el continente americano y la variación biológica dentro de los pueblos nativos americana [Reich 2012]. Una gran cantidad de grupos humanos descendientes de estas migraciones habitaban México al momento de la llegada de los españoles comandados por Hernán Cortés en 1519 [Díaz del Castillo, 1575]; en el centro del país, la geografía era dominada por los asentamientos de una gran cantidad de grupos nahuas (el hegemónico grupo mexica, junto con culhuaques, acolhuaques, xochimilcas, tlahuicas y otros), así como otomíes y tlaxcaltecas [Cline, 2008]. Sin embargo, las guerras de conquista y las epidemias de microorganismos traídos por los españoles (como la denominada *Huey cocoliztli*, posiblemente una fiebre hemorrágica viral altamente contagiosa) diezmaron las poblaciones indígenas del país y acabaron con alrededor del 90 % de los habitantes que existían al momento del contacto [Marr y Kiracofe, 2000; Jones, 2008; Wang *et al.*, 2008]. Adicionalmente, el establecimiento de la lengua nahua como *lingua franca* de las comunidades indígenas de la Nueva España por motivos militares, políticos y sociales [Frye, 2008; Cline, 2008] nubló los patrones de

distribución reales de las poblaciones nativas de México a lo largo del territorio nacional.

La migración europea hacia América comenzó con la incorporación de los primeros conquistadores/colonizadores (provenientes principalmente de Extremadura, Andalucía, los reinos de las Castillas, León, Portugal y Génova) en números poco significativos (probablemente alrededor de 2000) [Grunberg 2004]. No obstante, tras la caída del imperio mexica, la corona española envió una gran cantidad de españoles al Virreinato de la Nueva España, cerca de un cuarto de millón de individuos para mediados del siglo XVI y aproximadamente el doble para el siglo XVII [Axtell, 1991], la mayoría en calidad de conquistadores para terminar la tarea del sometimiento de los pueblos nativos del territorio español en América, pero también como sacerdotes, misioneros, clérigos, oficiales, artesanos, mercaderes, y otros oficios. Más aún, la migración europea ha sido una constante a lo largo de los siglos, si bien los números de migrantes de este continente sí han variado a través del tiempo. Por citar un ejemplo, al término de la guerra de independencia, numerosos emprendedores irlandeses, alemanes, españoles y de otras nacionalidades europeas llegaron a México no en búsqueda de trabajo y tierras, sino para generar riqueza a través de bancos e industrias, para invertir su capital y mejorar la condición económica de sus familias [Buchenau, 2001]. También las guerras mundiales y los procesos políticos internos, así como los procesos de **“blanqueo” de la población mexicana (como parte de las políticas porfirianas)** [González Navarro, 1993; Buchenau, 2001] han contribuido a la inmigración europea de manera reciente.

Esclavos africanos comenzaron a ser importados como artesanos, sirvientes y soldados, primero, y como fuerza laboral posteriormente, y desembarcaron en territorio mexicano en los puertos de Campeche y Veracruz provenientes de Cuba y otras islas del Caribe durante el

siglo XVI [Acuña, 2005: Aguirre, 1972; Manning, 1993; Grunberg, 2004]. Las tribus tukolor, serer, diola, bifada, malinke, twi, ashanta, hausa, kanuri y bantú provenientes de Zafi (Marruecos), São Jorge da **Mina, Costa de Oro (Côte d'Ivoire y Ghana), Cabo Verde (Senegal),** Senegambia (Senegal y Gambia), Dahomey (Benín), Biafra (Nigeria), y otras regiones del sureste, occidente y centro de África (como Angola y Namibia) sirvieron como principales fuentes de las que se extrajeron esclavos para su uso en el denominado Nuevo Mundo [Lisker *et al.*, 1965; Lovejoy, 1982]. La importación de esclavos africanos en la Nueva España cesó legalmente en 1779, con un número total aproximado de 130 000 a 150 000 africanos ingresados al país desde el arribo de los españoles [Aguirre-Beltrán, 1972; Lisker *et al.*, 1965].

Un elemento adicional también se introdujo a América por la política económica colonial de España. Ya sea como esclavos o por cuenta propia, la llegada de asiáticos con el ***Galeón de Manila*** (la famosa ***Não de China***) desde las costas orientales de Asia a México fue trascendental en la formación de una sociedad heterogénea que daría pie, eventualmente, al nacimiento de una nación multicultural. Los ***chinos de Manila***, principalmente chinos, japoneses, filipinos e indios orientales, constituían el grupo de individuos agrupados bajo ese nombre. Pero fue hasta mediados del siglo XIX cuando la diáspora asiática tocó la actual Latinoamérica con mayor fuerza: chinos migraron a México, Cuba, Perú y Centroamérica, los japoneses se establecieron en Perú y Brasil principalmente, con algunos asentamientos en México y Bolivia, todo ello en respuesta a las demandas laborales y a los nacientes imperialismo y capitalismo, en particular debido a la caída en el uso de mano de obra esclava africana [Hu-Dehart, 1995]; la inserción de los grupos migrantes asiáticos se dio principalmente hacia los sectores de servicios y comercio [Hu-Dehart 1989, 1995]. Hacia 1927, los inmigrantes

chinos se habían convertido en la mayor comunidad migrante no hispana con 24 000 individuos dispersos por todos los estados de México [Hu-Dehart, 1995].

El monto poblacional, las actividades económicas, el desarrollo industrial, la transición de los modos de producción originarios a los impuestos, la introducción de nuevos cultivos, la creación de ciudades, el abandono del campo, la destrucción de los ecosistemas y el acceso desigual a los servicios básicos, entre otras razones, han provocado la migración del campo a la ciudad, del campo a otros campos y del campo y las ciudades al extranjero: actualmente un tercio de la población indígena de los países latinoamericanos vive en áreas urbanas [Montemayor, 1971; Rubio, 1999; Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2000; Alderete, 2005; Martínez et al., 2003; UN-HABITAT y OHCHR, 2010]. Estos fenómenos sociales también han impactado en la composición genética de las poblaciones mediante la introducción (el 2,8 % de la población inmigrante por entidad en el país es de origen no mexicano [INEGI, 2000; Ortiz, 2006]) y pérdida de alelos en una población **“finita”, con la consecuente modificación de las frecuencias de alelos** y haplotipos, así como de parámetros poblacionales como el equilibrio de Hardy-Weimberg¹ (HWE).

Estas cuestiones deben ser tomadas en cuenta al momento de analizar la demografía genética de la población mexicana y más aún, no se debe perder de vista que el hecho de que las enfermedades hayan acabado con gran parte de la población indígena resalta el valor adaptativo de este sistema génico.

¹ Principio que establece que las frecuencias alélicas y genotípicas en una población permanecerán constantes de una generación a la siguiente en la ausencia de fuerzas de cambio evolutivas, tales como emparejamiento selectivo, mutación, selección, deriva génica y flujo génico.

1.3. El análisis de la diversidad biológica exhibida por las poblaciones mestizas mexicanas: el caso de la Ciudad de México.

Al momento de definir las poblaciones ancestrales por lo general se trata de regiones amplias con diferencias suficientes a nivel genético como para considerarlas diferentes, como por ejemplo Asia, Oceanía e islas del Pacífico, Europa Oriental, Europa Occidental, Medio Oriente, Norte de África, África Subsahariana, América del Norte, América Central y del Sur [González Galarza *et al.*, 2011]; empero, en zonas geográficas más restringidas y en particular en aquellas en las que se ofrece una limitación sociopolítica que en ocasiones no refleja el flujo poblacional existente entre distintos grupos humanos esto no es posible. Ante tal complejidad, el estudio de los alelos y haplotipos del sistema HLA en las distintas poblaciones de México (tanto originarias como producto del mestizaje biológico) aporta datos de interés sobre la diversidad producto de los procesos de conquista y colonización, sobre la recepción de nuevas variantes y asociaciones en el sistema y el impacto que tuvieron en la formación del acervo genético de las poblaciones mexicanas actuales. En el caso de la Ciudad de México, posiblemente estemos ante una de las poblaciones más estudiadas, tanto para el caso del sistema HLA como con otros marcadores. Estudios previos en esta ciudad apuntan a una importante contribución de haplotipos y alelos del sistema HLA de origen nativo americano al acervo genético de la misma, mientras que el componente europeo se mantiene como secundario en todos los estudios. El componente africano y, más recientemente, el asiático, no se determinan en todos los estudios y siempre ha sido estimado como bajo (< 10 %) (de Leo 1997; Gorodezky 2001; Barquera 2008; Juárez 2008; Vargas 2010; Ortega 2012; Barquera 2013).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Describir la distribución de los bloques génicos del sistema HLA clase I y clase II, así como los haplotipos conservados extendidos mediante el empleo de tipificación de alta resolución en una muestra de individuos mestizados de la Ciudad de México, y estimar las relaciones poblacionales y los componentes ancestrales de esta muestra en relación con otros reportes previos.

2.2. Objetivos particulares

- Describir la variación biológica y las frecuencias para los alelos de los genes *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* y *-DQB1* a nivel de alta resolución en una muestra de la Ciudad de México.
- Determinar las asociaciones de dos puntos (*HLA-C/-B* y *HLA-DRB1/-DQB1*), los haplotipos conservados extendidos (*HLA-C/-B/-DRB1/-DQB1*) y su extensión al gen *HLA-A* en una muestra de la Ciudad de México, mediante el uso de tipificación de alta resolución.
- Estimar las proporciones ancestrales de los componentes nativo americano, europeo, africano y asiático mediante el empleo del gen *HLA-B* y compararlas con las proporciones obtenidas por un conjunto de marcadores autosómicos no relacionados (*Short Tandem Repeats*, STRs).
- Analizar los datos por medio de un método estadístico de reducción de dimensiones a partir de una matriz de datos de

frecuencias de HLA-B en distintas poblaciones a nivel mundial y estudiar cómo se agrupa la muestra analizada con respecto de otros grupos humanos tipificados en la misma resolución.

- Cuantificar parámetros de diversidad genética en la muestra de mexicanos mestizados de la Ciudad de México.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestra analizada

Se analizaron 234 individuos mexicanos mestizados, incluyendo un grupo de 80 participantes mexicanos mestizados pertenecientes a 40 familias nucleares padre-madre-hijo. Un total de 468 haplotipos fueron analizados en este estudio. Cada participante es residente de la Ciudad de México y reportó ancestría mexicana con padres y abuelos nacidos en el país. La edad media de los sujetos en estudio fue de 38.2 ± 15.3 años, con una proporción mujer:hombre de 51:49.

3.2. Declaración sobre bioética

El Comité Revisor Institucional del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) revisó y aprobó los protocolos involucrados con los análisis genéticos. Todos los sujetos proporcionaron consentimiento informado por escrito, y autorizaron el almacenamiento de éste y de su material genético para este estudio y posteriores. En este estudio no se incluyeron menores de edad.

3.3. Tipificación de HLA

El DNA genómico de cada muestra fue obtenido a partir de células mononucleadas de sangre periférica con el uso del kit *QIAmp DNA mini kit* (Qiagen, Valencia, CA, EEUU). La tipificación para HLA de clase I y clase II de alta resolución fue llevada a cabo por un método basado en secuenciación (SBT por sus siglas en inglés) como se ha descrito previamente [Lebedeva 2011]. Brevemente, se amplificaron los exones 2 y 3 de los genes *HLA-A*, *-B* y *-C*, y el exón 2 de los

genes *HLA-DRB1* y *-DQB1* (las regiones más variables de los genes HLA, figura 1). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL con las siguientes concentraciones de componentes: 1.5 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH = 8.3), 200 mM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 10 pM de cada primer, 30 ng de DNA y 0.5 U de *Taq* DNA polimerasa en un termociclador PE9700 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EEUU) con las siguientes condiciones de amplificación: 5 min a 95 °C de desnaturalización inicial, treinta ciclos de tres temperaturas: 95 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 60 s, y una extensión final de 5 min a 72 °C. La secuencia de los productos de amplificación fue determinada mediante química *BigDye Terminator™* en un secuenciador *ABI PRISM® 3730xl Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EEUU) con las herramientas de comparación de secuencias del software de asignación de alelos con apoyo de la herramienta de alineamiento de la base de datos IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>) [Robinson 2003]. Las ambigüedades se resolvieron con el uso de primers de secuenciación grupo-específico (*group-specific sequencing primers*, GSSP) previamente reportados y validados [Lebedeva 2011].

3.4. Los bloques del sistema HLA y la asignación de haplotipos extendidos conservados (HEC)

Las frecuencias alélicas y haplotípicas se obtuvieron por conteo directo; 160 de los 468 haplotipos estudiados se obtuvieron por observación directa dado que se pudo determinar la fase gamética de los mismos a partir de la tipificación de familias nucleares padre-madre-hijo, mientras que el resto de los haplotipos se estimaron a partir de la tipificación de 154 individuos no relacionados. Los haplotipos se estimaron por un método de máxima verosimilitud mediante el uso del programa Arlequin v. 3.0 [Excoffier 2007]. El

mismo software se utilizó para calcular los parámetros poblacionales HWE, heterocigosidad observada (OH) y heterocigosidad esperada (EH) al nivel de *locus*-por-*locus* con 1×10^6 pasos en la cadena de Markov. Los valores de $p \leq 0.05$ entre OH y EH indicarían diferencia estadísticamente significativa y por tanto una desviación al HWE. Los haplotipos de dos puntos *HLA-C/-B*, *HLA-DRB1/-DQB1*, los CEH y su extensión al *HLA-A* fueron analizados con base en sus valores de **delta (Δ)**, **delta normalizada (Δ') entre pares de alelos y entre bloques** como se ha descrito previamente [Cao 2001] para estudiar el desequilibrio de ligamiento (LD en inglés) y su significancia **estadística. Los valores absolutos para $\Delta' = 1$ indican un LD completo**, mientras que valores de cero corresponden a ausencia de LD. Dado que un número considerable de las asociaciones arrojan valores de Δ' cercanos a uno –especialmente cuando se trata de una asociación aleatoria entre alelos poco frecuentes en la población en estudio- se empleó el parámetro estadístico t para **validar los datos de Δ'** ajustados por tamaño muestral y número de veces que cada alelo involucrado apareció en la muestra [Haseman 1972]. Sólo los valores de $t \geq 2.0$ fueron considerados significativos. La asignación de ancestría más probable (AMP) para cada haplotipo o bloque se hizo con base en frecuencias previamente reportadas [Cao 2001; Yunis 2005; Yunis 2003].

3.5. Cálculos de diversidad genética de la muestra

La diversidad genética de cada *loci* del sistema HLA fue evaluada por dos parámetros de uso en genética forense previamente analizados [Yasuda 1988; Shen 2010; Yan 2003; Tereba 1999] en este sistema: el contenido de información de polimorfismo (*polymorphism information content*, PIC) y el poder de discriminación (power of discrimination, PD) mediante el uso de la plataforma *PowerStat* ver. 1.2 (*Promega Corporation*, Fitchburg, WI, EEUU). El parámetro PIC

mide la fuerza de un marcador genético para estudios de ligamiento al indicar el grado de polimorfismo de un *locus*; valores > 0.5 se consideran altamente polimórficos [Shen 2010]. El valor de PD se define como la probabilidad de encontrar dos individuos no relacionados al azar con diferentes genotipos para un *locus* en particular en la población en estudio, y cuando $PD > 0.8$ indica un elevado polimorfismo en el contexto poblacional estudiado [Zhu 2010].

3.6. Estimaciones de mestizaje en mexicanos con genes HLA como estimadores

Las estimaciones de mestizaje se obtuvieron por un método de máxima verosimilitud mediante el empleo del programa *Leadmix* [Wang 2003], con $k = 4$ poblaciones parentales (África, Asia, América y Europa) y el gen *HLA-B* como estimador. El componente europeo fue calculado a partir de una muestra integrada ($N = 315$) consistente en datos del sur de Portugal [Spínola *et al.*, 2002] y una muestra de población de ascendencia europea de EEUU [Cao *et al.*, 2001]; los datos de la población nandi de Kenia [Cao *et al.*, 2004] sirvió como estimador para el componente parental africano ($N = 239$); una muestra integrada ($N = 146$) por datos de mixtecos de Oaxaca [Hollenbach *et al.*, 2001] y tarahumaras de Chihuahua [García *et al.*, 2006] fue empleada como componente nativo americano; finalmente, datos [Tratchenberg *et al.*, 2007] de un grupo han de China ($N = 281$) fueron usados para estimar la contribución asiática a la población muestreada. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) para 38 poblaciones con datos de frecuencias alélicas para el gen HLA-B con el uso del programa IBM SPSS Statistics Software (IBM Corporation, Armonk, NY, EEUU) para estudiar la distribución de las poblaciones humanas entre las ancestrías antes mencionadas. El PCA incluyó

datos poblacionales de Irlanda [Dunne *et al.*, 2008], Noroeste de Inglaterra [Alfirevic *et al.*, 2012], Alemania [Schmidt *et al.*, 2009], Austria [Rosenmayr *et al.*, 2011], España, Italia, Reino Unido [Pingel *et al.*, 2013], Francia [Loiseau *et al.*, 2007], gitanos de Andalucía (España; datos recolectados por López-Nevot *et al.*) [González *et al.*, 2011], Azores (Isla Terceira) [Spínola *et al.*, 2005], forros de São Tomé [Saldanha *et al.*, 2009], betis de Camerún [Torimiro *et al.*, 2006], bandiagaras de Mali, lusakas de Zambia, lúos y nandis de Kenia [Cao *et al.*, 2004], mandekas de Senegal [Sánchez *et al.*, 2000], Guinea Bissau [Spínola *et al.*, 2005], aleutas de la Isla de Bering (Rusia) [Moscoso *et al.*, 2008], una muestra del centro de Japón [Saito *et al.*, 2000], un banco de sangre de cordón umbilical de la Fundación Tzu Chi (Taiwán) [Wen *et al.*, 2008], han del sur de China [Tratchenberg *et al.*, 2007], norte de la India [Rani *et al.*, 2007], kensius de Malasia [Jinam *et al.*, 2010], kinh de Vietnam [Hoa *et al.*, 2008], tarahumaras del norte de México [García *et al.*, 2006], nativos americanos del Río Gila (EEUU) [Williams *et al.*, 2009], Yu'pik de Alaska (EEUU) [Leffell *et al.*, 2002], mixtecos, zapotecos y mixes de Oaxaca (México) [Hollenbach *et al.*, 2001], seris de Sonora (México) [Infante *et al.*, 2007], navajos de Nuevo México (EEUU) [Mack *et al.*, 2007], uros del Lago Titikaka (Perú) [Arnaiz *et al.*, 2007] y tobas de Rosario (Argentina; datos recolectados por Cintia Marcos *et al.*) [González *et al.*, 2011]. También se incluyeron, para comparar, dos poblaciones mestizas de México: una muestra de "mestizos mexicanos" [Middleton *et al.*, 2000] y una muestra de la ciudad de Guadalajara, en el occidente de México [Leal *et al.*, 2005]. Como una aproximación para estimar la diversidad y la contribución de bloques europeos, asiáticos y africanos previamente descritos [Yunis *et al.*, 2003; Yunis *et al.*, 2005] en nuestra muestra, se calcularon las frecuencias de bloques agregadas (ABF) [Yunis *et al.*, 2003; Yunis *et al.*, 2005] mediante la adición de aquellos bloques de

HLA clase I y clase II con frecuencias superiores al 1 % en la muestra en estudio.

3.7. Estimaciones de mestizaje en mexicanos mediante el uso de STRs

Se genotipificaron 15 marcadores autosómicos (*CSF1PO*, *FGA*, *THO1*, *TPOX*, *VWA*, *D3S11358*, *D5S818*, *D7S820*, *D8S1179*, *D13S317*, *D16S539*, *D18S51*, *D21S11*, *D19S433* y *D2S1338*) junto con el gen de la amelogenina con el kit AmpFI STR Identifier (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EEUU). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp 7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EEUU) con el uso de 1 ng de DNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de PCR empleadas fueron: desnaturalización inicial de 11 min a 95 °C, seguida de 28 ciclos de tres temperaturas: 94 °C por un minuto, 59 °C por un minuto y 72 °C por un minuto con una extensión final de 60 minutos a 60 °C. Los productos de PCR fueron diluidos 1:15 en formamida *Hi-Di™* y se añadió el estándar de tamaño interno *GS500-LIZ* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EEUU) y se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador *ABIPrism 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EEUU). Las asignaciones alélicas fueron realizadas con ayuda del software *Genotype 3.7* por comparación con las escaleras de peso molecular (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EEUU). El análisis para estimar las proporciones ancestrales por medio de frecuencias de STRs se realizó por un método de agrupamiento basado en modelaje con el programa *Structure* ver. 2.3.4 [Falush *et al.*, 2003] asumiendo $k = 3$ poblaciones con españoles [Sanz 2001], fang de África [Calzada *et al.*, 2005] y una muestra integrada nativa americana (huastecos y tepehuas) [Barrot *et al.*, 2005, González *et al.*, 2008] de la región central de México como poblaciones parentales.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Frecuencias alélicas de los genes *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* y *-DQB1* en individuos mexicanos mestizados.

La distribución de los alelos de los genes *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* y *-DQB1* se encuentra en la tabla 1. Se encontraron 34 alelos de *HLA-A*, 64 de *HLA-B*, 28 de *HLA-C*, 39 de *HLA-DRB1* y 15 de *HLA-DQB1*. Los alelos más frecuentes fueron: **1) *HLA-A*:** A*02:01, A*24:02, A*02:06, A*68:01 y A*31:01, **2) *HLA-B*:** B*39:05, B*39:06, B*51:01, B*35:01 y B*40:02; **3) *HLA-C*:** C*07:02, C*04:01, C*01:02, C*03:04, C*06:02 y C*07:01; **4) *HLA-DRB1*:** DRB1*08:02, DRB1*04:07, DRB1*14:06, DRB1*07:01, DRB1*04:04 y DRB1*16:02; y **5) *HLA-DQB1*:** DQB1*03:01, DQB1*03:02, DQB1*04:02, DQB1*05:01, and DQB1*02:02, todos ellos con frecuencias superiores a 5 %.

Tabla 1: Frecuencias alélicas de *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* y *-DQB1* en 234 mexicanos.

HLA-A	F	HLA-B	F	HLA-C	F	HLA-DRB1	F	HLA-DQB1	F
A*02:01	0.2286	B*39:05	0.0791	C*07:02	0.2073	DRB1*08:02	0.1944	DQB1*03:01	0.2479
A*24:02	0.1688	B*39:06	0.0684	C*04:01	0.1859	DRB1*04:07	0.1175	DQB1*03:02	0.2457
A*02:06	0.0962	B*51:01	0.0598	C*01:02	0.0897	DRB1*14:06	0.1004	DQB1*04:02	0.2051
A*68:01	0.0791	B*35:01	0.0577	C*03:04	0.0662	DRB1*07:01	0.0705	DQB1*05:01	0.0684
A*31:01	0.0791	B*40:02	0.0534	C*06:02	0.0598	DRB1*04:04	0.0662	DQB1*02:02	0.0598
A*01:01	0.0363	B*48:01	0.0427	C*07:01	0.0534	DRB1*16:02	0.0641	DQB1*06:02	0.0363
A*68:03	0.0342	B*07:02	0.0406	C*08:01	0.0470	DRB1*15:01	0.0363	DQB1*02:01	0.0321
A*03:01	0.0321	B*35:17	0.0385	C*08:02	0.0406	DRB1*03:01	0.0321	DQB1*03:03	0.0214
A*68:02	0.0299	B*35:12	0.0385	C*03:05	0.0342	DRB1*13:01	0.0256	DQB1*06:04	0.0214
A*29:02	0.0256	B*14:02	0.0321	C*03:03	0.0299	DRB1*01:02	0.0235	DQB1*05:03	0.0171
A*11:01	0.0214	B*15:15	0.0321	C*16:01	0.0256	DRB1*14:02	0.0235	DQB1*06:03	0.0150
A*26:01	0.0192	B*44:03	0.0278	C*12:03	0.0256	DRB1*04:03	0.0214	DQB1*06:01	0.0107
A*23:01	0.0171	B*52:01	0.0214	C*15:09	0.0235	DRB1*13:02	0.0214	DQB1*03:19	0.0107
A*02:05	0.0171	B*15:01	0.0214	C*05:01	0.0214	DRB1*04:02	0.0214	DQB1*05:02	0.0064
A*30:02	0.0150	B*39:02	0.0214	C*15:02	0.0192	DRB1*04:11	0.0192	DQB1*05:new [†]	0.0021
A*30:01	0.0128	B*35:43	0.0192	C*02:02	0.0128	DRB1*01:01	0.0192		
A*33:01	0.0128	B*49:01	0.0192	C*14:02	0.0085	DRB1*11:04	0.0171		
A*66:01	0.0128	B*18:01	0.0171	C*08:03	0.0085	DRB1*14:01	0.0171		
A*32:01	0.0085	B*15:30	0.0171	C*16:04	0.0043	DRB1*11:01	0.0128		
A*24:25	0.0064	B*57:01	0.0150	C*02:10	0.0043	DRB1*10:01	0.0128		
A*25:01	0.0064	B*35:14	0.0150	C*03:02	0.0043	DRB1*15:02	0.0107		
A*68:05	0.0064	B*13:02	0.0128	C*12:02	0.0043	DRB1*11:02	0.0085		
A*03:02	0.0064	B*53:01	0.0128	C*04:07	0.0043	DRB1*12:02	0.0064		
A*01:02	0.0043	B*38:01	0.0128	C*16:02	0.0021	DRB1*13:03	0.0064		
A*33:03	0.0043	B*58:02	0.0128	C*07:04	0.0021	DRB1*04:01	0.0064		
A*02:211	0.0021	B*39:01	0.0107	C*15:05	0.0021	DRB1*01:03	0.0064		
A*34:01	0.0021	B*40:05	0.0107	C*17:01	0.0021	DRB1*16:01	0.0043		
A*01:03	0.0021	B*35:03	0.0107	C*03:new [§]	0.0021	DRB1*04:10	0.0043		
A*34:02	0.0021	B*41:01	0.0107			DRB1*08:04	0.0043		
A*30:04	0.0021	B*44:02	0.0107			DRB1*12:01	0.0043		
A*74:01	0.0021	B*35:24	0.0085			DRB1*13:05	0.0021		
A*26:17	0.0021	B*37:01	0.0085			DRB1*04:05	0.0021		
A*02:02	0.0021	B*14:01	0.0085			DRB1*15:03	0.0021		
A*02:24	0.0021	B*50:01	0.0085			DRB1*08:03	0.0021		
		B*40:27	0.0085			DRB1*04:08	0.0021		
		B*55:01	0.0064			DRB1*03:02	0.0021		
		B*58:01	0.0064			DRB1*08:01	0.0021		
		B*45:01	0.0064			DRB1*09:01	0.0021		
		B*27:05	0.0064			DRB1*13:04	0.0021		
		B*08:01	0.0064						
		B*39:08	0.0064						
		B*35:08	0.0064						
		B*35:16	0.0064						
		B*15:17	0.0064						
		B*51:02	0.0043						
		B*15:02	0.0043						
		B*15:03	0.0043						
		B*39:10	0.0043						
		B*15:39	0.0043						
		B*15:31	0.0043						
		B*35:02	0.0043						
		B*40:04	0.0021						
		B*15:16	0.0021						
		B*40:20	0.0021						
		B*40:08	0.0021						
		B*15:18	0.0021						
		B*15:10	0.0021						
		B*57:03	0.0021						
		B*27:03	0.0021						
		B*07:14	0.0021						
		B*35:20	0.0021						
		B*56:01	0.0021						
		B*35:40N	0.0021						
		B*35:new*	0.0021						

4.2. Distribución de los bloques *HLA-C/-B* y *-DRB1/-DQB1* en individuos mexicanos mestizados.

Los bloques *HLA-C/-B* encontrados en este grupo de mexicanos mestizados se agruparon en la tabla 2. Se encontraron veintiséis bloques *HLA-C/-B* con AMP nativa americana (41.3 %). Los más frecuentes (con frecuencias superiores al 3.0 %) fueron: C*07:02/B*39:05 (HF = 0.0726), C*07:02/B*39:06 (HF = 0.0619), C*04:01/B*35:17 (HF = 0.0363), C*04:01/B*35:12 (HF = 0.0341) y C*08:01/B*48:01 (HF = 0.0320). Dieciocho bloques *HLA-C/-B* (13.2 %) de AMP europea fueron reportados, los más frecuentes son: C*07:02/B*07:02 (HF = 0.0320), C*16:01/B*44:03 (HF = 0.0170), C*12:03/B*38:01 (HF = 0.0128) y C*05:01/B*18:01 (HF = 0.0106). Los haplotipos *-C/-B* predominantemente europeos pero encontrados en otras poblaciones fueron C*04:01/B*35:01 (HF = 0.0320), C*08:02/B*14:02 (HF = 0.0235), C*15:02/B*51:01 (HF = 0.0192) y C*06:02/B*13:02 (HF = 0.0106). También se encontraron 12 bloques (5.5 %) de AMP africana y C*07:01/B*49:01 (HF = 0.0128), C*04:01/B*53:01 (HF = 0.0128) y C*06:02/B*58:02 (HF = 0.0128) fueron los más representativos. También se encontraron 11 bloques (3.3 %) de AMP asiática en esta muestra, todos ellos poco comunes, con frecuencias por debajo del 1.0 %. Cincuenta y siete bloques *HLA-C/-B* no habían sido reportados previamente (19.4 %) –incluyendo dos haplotipos con alelos de *HLA-B* y *HLA-C* no descritos con anterioridad-, aunque la inmensa mayoría de ellos no rebasaron frecuencias por encima del 1.0 %. C*01:02/B*15:15 (HF = 0.0277), C*01:02/B*35:43 (HF = 0.0192), C*15:09/B*51:01 (HF = 0.0192), C*03:03/B*52:01 (HF = 0.0129) y C*04:01/B*35:14 (HF = 0.0128) representaron las principales asociaciones *HLA-C/-B* no descritas previamente encontradas en esta muestra.

Las frecuencias de los bloques *HLA-DRB1/-DQB1* se encuentran resumidas en la tabla 3. Ocho bloques *HLA-DRB1/-DQB1* (n = 240 de

468, 51.2 %) en los que la AMP nativa americana corresponde a la mayoría de los bloques de HLA clase II encontrados en esta muestra. Los bloques más representativos fueron: DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.1902), DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.1153), DRB1*14:06/DQB1*03:01 (HF = 0.0983), DRB1*16:02/DQB1*03:01 (HF = 0.0641) y DRB1*14:02/DQB1*03:01 (HF = 0.0235), todos ellos con frecuencias por encima de 5 %. Adicionalmente, diez bloques **-DRB1/-DQB1** de AMP europea y 19 predominantemente europeos –encontrados en otras poblaciones– fueron hallados frecuentemente en esta muestra. Por ejemplo, los bloques: DRB1*03:01/DQB1*02:01 (HF = 0.0320); DRB1*15:01/DQB1*06:02 (HF = 0.0320) y DRB1*04:02/DQB1*03:02 (HF = 0.0214) fueron los haplotipos de AMC europea más frecuentes encontrados en este grupo. Los bloques DRB1*04:04/DQB1*03:02 (HF = 0.0620); DRB1*07:01/DQB1*02:02 (HF = 0.0598); DRB1*01:02/DQB1*05:01 (HF = 0.0235) y DRB1*04:03/DQB1*03:02 (HF = 0.0214) fueron los más comunes encontrados también en poblaciones europeas. Todos estos haplotipos exhibieron un LD significativo con valores de Δ' superiores a 0.85. También se encontraron ocho bloques con AMP africana y siete con AMP asiática con frecuencias menores al 1.0 %, excepto por el bloque DRB1*15:02/DQB1*06:01. Seis asociaciones de dos puntos **-DRB1/-DQB1** no encontrados en poblaciones autóctonas de América [González Galarza *et al.*, 2011], incluyendo un haplotipo con el alelo DRB1*16:01 en asociación con un alelo nuevo del grupo DQB1*05, ueron reportados en esta muestra. Todas las asociaciones **HLA-C/-B** (tabla 2) y **HLA-DRB1/-DQB1** (tabla 3) mencionadas se encontraron en LD con valores de Δ' significativos y se demostró su relevancia estadística con valores de $t \geq 2.0$ y $p < 0.0005$.

Tabla 2: Frecuencias de los bloques *HLA-C/-B* en 234 individuos mexicanos (468 haplotipos).

	-C-B block		n	H.F.	Δ'	t		-C-B block		n	H.F.	Δ'	t	
Amerindian	C*07:02	B*39:05	34	0.0726	0.8975	6.36	Asian	C*04:01	B*35:16	3	0.0064	1.0000	1.80	
	C*07:02	B*39:06	29	0.0619	0.8025	5.40		C*14:02	B*51:01	3	0.0064	0.7339	1.71	
	C*04:01	B*35:17	17	0.0363	1.0000	4.43		C*08:01	B*15:02	2	0.0042	1.0000	1.42	
	C*04:01	B*35:12	16	0.0341	0.8632	4.14		C*07:04	B*15:18	1	0.0021	1.0000	1.00	
	C*08:01	B*48:01	15	0.0320	0.7376	4.02		C*03:03	B*35:01	1	0.0021	0.0141	0.19	
	C*03:04	B*40:02	11	0.0235	0.4196	3.20		C*01:02	B*35:01	1	0.0021	-0.5908	-1.21	
	C*03:05	B*40:02	10	0.0213	0.6045	3.19		C*12:03	B*35:03	1	0.0021	0.1788	0.90	
	C*01:02	B*15:30	8	0.0170	1.0000	2.92		C*07:02	B*40:02	1	0.0021	-0.8007	-2.17	
	C*01:02	B*15:01	7	0.0149	0.6701	2.61		C*04:01	B*40:05	1	0.0021	0.0154	0.06	
	C*03:04	B*39:02	5	0.0106	0.4642	2.13		C*01:02	B*55:01	1	0.0021	0.2670	0.79	
	B*35:01	C*03:05	5	0.0106	0.2700	1.98		C*03:02	B*58:01	1	0.0021	0.4967	1.00	
	C*04:01	B*35:03	4	0.0085	0.7538	1.93		Total		16	0.0338			
	C*04:01	B*35:24	4	0.0085	1.0000	2.10		Unknown	C*01:02	B*15:15	13	0.0277	0.8534	3.71
	C*07:02	B*39:01	4	0.0085	0.7471	1.93			C*01:02	B*35:43	9	0.0192	1.0000	3.10
	C*07:02	B*39:02	4	0.0085	0.2414	1.12			C*15:09	B*51:01	9	0.0192	0.8065	3.06
	C*03:04	B*40:05	3	0.0064	0.5714	1.66			C*04:01	B*35:14	6	0.0128	1.0000	2.58
C*07:01	B*15:17	3	0.0064	1.0000	1.75	C*03:03	B*52:01		6	0.0128	0.5876	2.47		
C*07:02	B*39:08	3	0.0064	1.0000	1.83	C*04:01	B*35:08		3	0.0064	1.0000	1.80		
C*08:03	B*48:01	3	0.0064	0.7387	1.72	C*03:04	B*40:27		3	0.0064	0.7321	1.71		
C*02:02	B*27:05	2	0.0042	0.6623	1.41	C*06:02	B*07:02		2	0.0042	0.0540	0.68		
C*08:01	B*51:02	2	0.0042	1.0000	1.42	C*08:01	B*14:01		2	0.0042	-1.0000	-1.28		
C*07:02	B*35:01	1	0.0021	-0.8228	-2.37	C*04:07	B*15:31		2	0.0042	1.0000	1.42		
C*03:04	B*35:01	1	0.0021	-0.4456	-0.73	C*03:03	B*15:39		2	0.0042	1.0000	1.42		
C*03:05	B*39:06	1	0.0021	-0.0938	-0.10	C*06:02	B*35:02		2	0.0042	1.0000	1.42		
C*03:04	B*40:08	1	0.0021	1.0000	1.00	C*07:02	B*51:01		2	0.0042	-0.6583	-1.85		
C*03:04	B*51:01	1	0.0021	-0.4654	-0.79	C*15:05	B*07:02		1	0.0021	1.0000	1.00		
Total		194	0.4133			C*07:01	B*07:14		1	0.0021	1.0000	1.00		
Caucasian	C*07:02	B*07:02	15	0.0320	0.7893	3.91	C*03:03		B*13:02	1	0.0021	0.1407	0.85	
	C*16:01	B*44:03	8	0.0170	0.6571	2.89	C*05:01	B*14:02	1	0.0021	0.0699	0.70		
	C*12:03	B*38:01	6	0.0128	1.0000	2.50	C*08:03	B*14:02	1	0.0021	0.2249	0.90		
	C*05:01	B*18:01	5	0.0106	0.6167	2.26	C*02:10	B*14:02	1	0.0021	0.4833	0.97		
	C*05:01	B*44:02	4	0.0085	0.7956	2.03	C*03:03	B*15:01	1	0.0021	0.0720	0.72		
	C*06:02	B*50:01	4	0.0085	1.0000	2.04	C*08:02	B*15:03	1	0.0021	0.4787	0.96		
	C*07:01	B*08:01	3	0.0064	1.0000	1.75	C*03:02	B*15:10	1	0.0021	1.0000	1.00		
	C*06:02	B*37:01	3	0.0064	0.7339	1.71	C*04:01	B*15:15	1	0.0021	-0.6444	-1.31		
	C*04:01	B*44:03	3	0.0064	0.0533	0.34	C*07:02	B*15:15	1	0.0021	-0.6811	-1.43		
	C*03:04	B*15:01	2	0.0042	0.1427	1.00	C*08:02	B*18:01	1	0.0021	0.0876	0.70		
	C*12:03	B*18:01	2	0.0042	0.2301	1.32	C*01:02	B*27:05	1	0.0021	0.2670	0.79		

Tabla 2 (cont.): Frecuencias de los bloques *HLA-C/-B* en 234 individuos mexicanos (468 haplotipos).

	C*04:01	B*39:06	2	0.0042	-0.6667	-1.94		C*16:01	B*35:01	1	0.0021	0.0267	0.31
	C*06:02	B*57:01	2	0.0042	0.2398	1.19		C*15:09	B*35:01	1	0.0021	0.0347	0.37
	C*02:02	B*14:02	1	0.0021	0.1388	0.84		C*07:01	B*35:01	1	0.0021	-0.3126	-0.43
	C*17:01	B*41:01	1	0.0021	1.0000	1.00		C*03:03	B*35:12	1	0.0021	0.0340	0.47
	C*07:01	B*51:01	1	0.0021	-0.3371	-0.48		C*07:02	B*35:12	1	0.0021	-0.7342	-1.71
	C*04:01	B*56:01	1	0.0021	1.0000	1.04		C*04:01	B*35:20	1	0.0021	1.0000	1.04
	C*07:02	B*57:01	1	0.0021	-0.3166	-0.41		C*15:09	B*35:40N	1	0.0021	1.0000	1.00
Total			64	0.1359				C*03:04	B*35:New*	1	0.0021	1.0000	1.00
								C*03:03	B*37:01	1	0.0021	0.2267	0.91
Caucasian shared with other populations	C*04:01	B*35:01	15	0.0320	0.4530	3.23		C*03:04	B*39:01	1	0.0021	0.1427	0.71
	C*08:02	B*14:02	11	0.0235	0.7219	3.40		C*03:New⁵	B*39:02	1	0.0021	1.0000	1.00
	C*15:02	B*51:01	9	0.0192	1.0000	3.09		C*04:01	B*39:05	1	0.0021	-0.8559	-2.83
	C*07:01	B*49:01	6	0.0128	0.6477	2.45		C*01:02	B*39:05	1	0.0021	-0.7014	-1.75
	C*06:02	B*13:02	5	0.0106	0.8226	2.26		C*02:02	B*39:05	1	0.0021	0.0945	0.55
	C*08:02	B*14:01	4	0.0085	1.0000	2.04		C*03:04	B*39:06	1	0.0021	-0.5323	-0.99
	C*07:01	B*41:01	4	0.0085	0.7886	2.01		C*07:01	B*39:06	1	0.0021	-0.4200	-0.67
	C*12:02	B*52:01	2	0.0042	1.0000	1.42		C*04:01	B*40:02	1	0.0021	-0.7778	-2.06
	C*02:02	B*40:02	1	0.0021	0.1212	0.72		C*07:02	B*40:04	1	0.0021	1.0000	1.05
	C*03:03	B*55:01	1	0.0021	0.3126	0.94		C*07:02	B*40:05	1	0.0021	-0.0433	-0.04
Total			58	0.1235				C*03:04	B*40:20	1	0.0021	1.0000	1.00
								C*16:04	B*44:02	1	0.0021	0.4946	0.99
African	C*04:01	B*53:01	6	0.0128	1.0000	2.58		C*08:01	B*44:03	1	0.0021	0.0310	0.40
	C*06:02	B*58:02	6	0.0128	1.0000	2.51		C*16:02	B*44:03	1	0.0021	1.0000	1.00
	C*07:01	B*57:01	3	0.0064	0.3960	1.62		C*16:01	B*48:01	1	0.0021	0.0420	0.50
	C*12:03	B*39:10	2	0.0042	1.0000	1.42		C*08:02	B*48:01	1	0.0021	0.0100	0.18
	C*06:02	B*45:01	2	0.0042	0.6453	1.38		C*01:02	B*49:01	1	0.0021	0.0226	0.19
	C*02:10	B*15:03	1	0.0021	0.4978	1.00		C*06:02	B*49:01	1	0.0021	0.0540	0.47
	C*14:02	B*15:16	1	0.0021	1.0000	1.00		C*07:02	B*49:01	1	0.0021	-0.4685	-0.72
	C*02:02	B*27:03	1	0.0021	1.0000	1.00		C*08:02	B*51:01	1	0.0021	-0.1278	-0.14
	C*16:01	B*45:01	1	0.0021	0.3156	0.95		C*08:01	B*51:01	1	0.0021	-0.2468	-0.32
	C*16:01	B*51:01	1	0.0021	0.0245	0.28		C*16:04	B*52:01	1	0.0021	0.4890	0.98
	C*07:01	B*57:03	1	0.0021	1.0000	1.00		C*06:02	B*52:01	1	0.0021	0.0422	0.41
	C*07:01	B*58:01	1	0.0021	0.2954	0.89		C*04:01	B*55:01	1	0.0021	0.1795	0.49
								C*08:01	B*40:27	1	0.0021	0.2127	0.85
Total			26	0.0551				C*12:03	B*57:01	1	0.0021	0.1201	0.85
								C*04:01	B*58:01	1	0.0021	0.1795	0.49
							Total			110	0.2326		

Blocks of each ancestry (Amerindian, Caucasian, Caucasian shared with other populations, African, and Asian) were defined as those found in original populations with H.F. >1,0%, and not found in other native human groups in frequencies higher than 1,0%. We consider *t* value must be ≥ 2.0 to denote statistically significant association and thus validate Δ' (shaded values).

*Similar to B*35:01 with a mutation at codon 207 ggc>tgc (Gly>Cys).

⁵Similar to C*03:04 with a mutation at codon 189 gtg>atg (Val>Met).

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t002

Tabla 3: Frecuencias de bloques *HLA-DRB1/-DQB1* en 234 individuos mexicanos mixtos (468 haplotipos).

	DRB1-DQB1 block	n	H.F.	Δ'	t		DRB1-DQB1 block	n	H.F.	Δ'	t	
Amerindian	DRB1*08:02 DQB1*04:02	89	0.1902	0.9723	12.33	African	DRB1*10:01 DQB1*05:01	5	0.0107	0.8211	2.24	
	DRB1*04:07 DQB1*03:02	54	0.1153	0.9518	8.51		DRB1*13:01 DQB1*03:03	4	0.0086	0.3942	1.96	
	DRB1*14:06 DQB1*03:01	46	0.0983	0.9717	7.88		DRB1*08:04 DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.55	
	DRB1*16:02 DQB1*03:01	30	0.0641	1.0000	6.25		DRB1*03:02 DQB1*04:02	1	0.0022	1.0000	1.05	
	DRB1*14:02 DQB1*03:01	11	0.0235	1.0000	3.68		DRB1*12:01 DQB1*05:01	1	0.0022	0.4632	0.93	
	DRB1*04:11 DQB1*03:02	8	0.0171	0.8526	2.93		DRB1*13:01 DQB1*05:01	1	0.0022	0.0159	0.18	
	DRB1*04:10 DQB1*04:02	1	0.0022	0.3706	0.71		DRB1*13:04 DQB1*03:01	1	0.0022	1.0000	1.10	
	DRB1*04:11 DQB1*04:02	1	0.0022	-0.4595	-0.70		DRB1*15:03 DQB1*06:02	1	0.0022	1.0000	1.00	
Total		240	0.5129			Total		16	0.0346			
Caucasian	DRB1*03:01 DQB1*02:01	15	0.0320	1.0000	4.02	Asian	DRB1*11:02 DQB1*03:01	3	0.0064	0.6674	1.60	
	DRB1*15:01 DQB1*06:02	15	0.0320	0.8779	4.01		DRB1*04:04 DQB1*04:02	2	0.0043	-0.6862	-2.03	
	DRB1*04:02 DQB1*03:02	10	0.0214	1.0000	3.50		DRB1*09:01 DQB1*03:03	1	0.0022	1.0000	1.00	
	DRB1*11:04 DQB1*03:01	8	0.0171	1.0000	3.13		DRB1*12:01 DQB1*03:01	1	0.0022	0.3348	0.63	
	DRB1*13:01 DQB1*06:03	6	0.0128	1.0000	2.49		DRB1*13:01 DQB1*06:02	1	0.0022	0.0487	0.59	
	DRB1*07:01 DQB1*03:03	5	0.0107	0.4620	2.10		DRB1*13:02 DQB1*05:01	1	0.0022	0.0338	0.33	
	DRB1*04:01 DQB1*03:02	3	0.0064	1.0000	1.90		DRB1*15:01 DQB1*05:01	1	0.0022	-0.1415	-0.16	
	DRB1*11:01 DQB1*03:01	2	0.0043	0.1130	0.40							
	DRB1*04:07 DQB1*03:01	1	0.0022	-0.9268	-3.80		Total		10	0.0217		
	DRB1*08:03 DQB1*03:01	1	0.0022	1.0000	-0.60							
Total		66	0.1411									
Caucasian shared with other populations	DRB1*04:04 DQB1*03:02	29	0.0620	0.9144	5.92	DRB1*04:07 DQB1*06:04	1	0.0022	-0.1509	-0.17		
	DRB1*07:01 DQB1*02:02	28	0.0598	1.0000	5.66	DRB1*10:01 DQB1*05:02	1	0.0022	0.3247	0.98		
	DRB1*01:02 DQB1*05:01	11	0.0235	1.0000	3.41	DRB1*11:02 DQB1*03:19	1	0.0022	0.2419	0.98		
	DRB1*04:03 DQB1*03:02	10	0.0214	1.0000	3.50	DRB1*14:06 DQB1*04:02	1	0.0022	-0.8965	-3.37		
	DRB1*01:01 DQB1*05:01	9	0.0192	1.0000	3.07	DRB1*16:01 DQB1*05:New [†]	1	0.0022	1.0000	1.00		
	DRB1*13:02 DQB1*06:04	9	0.0192	0.8978	3.07	Total		7	0.0153			
	DRB1*14:01 DQB1*05:03	8	0.0171	1.0000	2.89							
	DRB1*15:02 DQB1*06:01	5	0.0107	1.0000	2.27							
	DRB1*11:01 DQB1*03:19	4	0.0086	0.7974	2.02							
	DRB1*01:03 DQB1*05:01	3	0.0064	1.0000	1.75							
	DRB1*12:02 DQB1*03:01	3	0.0064	1.0000	1.90							
	DRB1*13:03 DQB1*03:01	3	0.0064	1.0000	1.90							
	DRB1*04:05 DQB1*03:02	1	0.0022	1.0000	1.09							
	DRB1*04:08 DQB1*03:01	1	0.0022	1.0000	1.10							
	DRB1*04:10 DQB1*03:02	1	0.0022	0.3366	0.63							
	DRB1*08:01 DQB1*04:02	1	0.0022	1.0000	1.05							
	DRB1*13:05 DQB1*03:01	1	0.0022	1.0000	1.10							
	DRB1*15:01 DQB1*05:02	1	0.0022	0.3081	0.93							
	DRB1*16:01 DQB1*05:02	1	0.0022	0.4968	1.00							
	Total		129	0.2761								

Blocks of each ancestry (Amerindian, Caucasian, Caucasian shared with other populations, African and Asian) were defined as those found in original populations with H.F. >1,0%, and not found in other native human groups in frequencies higher than 1,0%. We consider t value must be ≥ 2.0 to denote statistically significant association and thus validate Δ' (shaded values).[†] Similar to DQB1*05:02 with a silent mutation at codon 133 cgg>cga.

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t003

4.3. Haplotipos HLA extendidos conservados.

Se enlistaron los haplotipos extendidos conservados (HEC) *HLA-C/-B/-DRB1/-DQB1* en la tabla 4. Un total de 23 haplotipos nativos americanos, diez europeos, ocho europeos compartidos con otras poblaciones, uno africano, uno asiático y 37 no previamente reportados fueron encontrados en esta muestra de mexicanos mestizados. Los HEC nativos americanos con frecuencias superiores al 1.0 % fueron C*07:02/B*39:05/DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.0406); C*07:02/B*39:06/DRB1*14:06/DQB1*03:01 (HF = 0.0342); C*04:01/ B*35:17/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0299); C*01:02/B*15:15/ DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0171); C*08:01/B*48:01/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0171) y C*04:01/ B*35:12/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.015). Los bloques de AMP europea con frecuencias por encima de 1.0 % incluyeron: C*07:02/B*07:02/DRB1*15:01/DQB1*06:02 (HF = 0.0150), C*16:01/B*44:03/DRB1*07:01/DQB1*02:02 (HF = 0.0128); y C*08:02/B*14:02/ DRB1*01:02/DQB1*05:01 (HF = 0.0107). Ningún haplotipo africano, asiático, europeo compartido con otras poblaciones ni reportado previamente se encontró en frecuencias superiores a 1.0 %, excepto por el haplotipo C*07:02/B*39:05/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0107), aunque aparentemente no está en desequilibrio de ligamiento. Para el resto de los HEC, los valores de $t \geq 2.0$.

Tabla 4: Haplotipos extendidos conservados del sistema HLA en 234 individuos mexicanos (468 haplotipos).

C-B-DRB1-DQB1 haplotype				n	H.F.	Δ'	t	C-B-DRB1-DQB1 haplotype				n	H.F.	Δ'	t		
Amerindian	C*07:02	B*39:05	DRB1*04:07	DQB1*03:02	19	0.0406	0.5025	4.15	African	C*06:02	B*58:02	DRB1*13:01	DQB1*03:03	4	0.0086	1.0000	2.02
	C*07:02	B*39:06	DRB1*14:06	DQB1*03:01	16	0.0342	0.5482	3.89		Total	4	0.0086					
	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	14	0.0299	0.7256	3.64	Asian	C*08:01	B*15:02	DRB1*12:02	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.42
	C*01:02	B*15:15	DRB1*08:02	DQB1*04:02	8	0.0171	0.5251	2.45		Total	2	0.0043					
	C*08:01	B*48:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	8	0.0171	1.0000	2.23	Unknown	C*07:02	B*39:05	DRB1*08:02	DQB1*04:02	5	0.0107	-0.2267	-0.14
	C*04:01	B*35:12	DRB1*08:02	DQB1*04:02	7	0.0150	0.3054	1.78		C*04:01	B*53:01	DRB1*13:02	DQB1*06:04	4	0.0086	0.6601	2.01
	C*01:02	B*15:30	DRB1*08:02	DQB1*04:02	4	0.0086	0.3826	1.49	C*04:01	B*35:14	DRB1*16:02	DQB1*03:01	4	0.0086	0.6438	1.95	
	C*03:05	B*40:02	DRB1*04:07	DQB1*03:02	4	0.0086	0.3234	1.61	C*01:02	B*35:43	DRB1*04:03	DQB1*03:02	4	0.0086	0.4323	1.98	
	C*15:02	B*51:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	4	0.0086	0.3140	1.36	C*03:04	B*40:02	DRB1*16:02	DQB1*03:01	4	0.0086	0.3200	1.78	
	C*03:05	B*35:01	DRB1*04:07	DQB1*03:02	3	0.0064	0.5489	1.59	C*07:02	B*39:06	DRB1*04:07	DQB1*03:02	4	0.0086	0.0394	-0.66	
	C*04:01	B*35:17	DRB1*16:02	DQB1*03:01	3	0.0064	0.1096	1.14	C*01:02	B*15:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.2944	1.13	
	C*07:02	B*39:05	DRB1*16:02	DQB1*03:01	3	0.0064	0.0295	0.49	C*04:01	B*35:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.0121	0.09	
	C*03:05	B*40:02	DRB1*04:04	DQB1*03:02	3	0.0064	0.2538	1.48	C*07:02	B*39:05	DRB1*14:02	DQB1*03:01	3	0.0064	0.2158	1.37	
	C*03:03	B*52:01	DRB1*14:06	DQB1*03:01	3	0.0064	0.4455	1.55	C*08:01	B*48:01	DRB1*04:04	DQB1*03:02	3	0.0064	0.1472	1.28	
	C*01:02	B*15:01	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.2368	1.17	C*15:09	B*51:01	DRB1*04:07	DQB1*03:02	3	0.0064	0.2482	1.27	
	C*01:02	B*15:30	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	0.1682	0.93	C*07:02	B*07:02	DRB1*11:04	DQB1*03:01	2	0.0043	0.2235	1.28	
	C*04:01	B*35:24	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.4658	1.32	C*01:02	B*15:01	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	0.2385	1.18	
	C*01:02	B*35:43	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.0396	0.21	C*04:07	B*15:31	DRB1*14:01	DQB1*05:03	2	0.0043	1.0000	1.42	
	C*07:02	B*39:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.3826	1.05	C*05:01	B*18:01	DRB1*11:01	DQB1*03:19	2	0.0043	0.4946	1.41	
	C*03:04	B*39:02	DRB1*04:11	DQB1*03:02	2	0.0043	0.3896	1.39	C*04:01	B*35:01	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.0740	0.77	
C*07:02	B*39:02	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.3826	1.05	C*06:02	B*35:02	DRB1*11:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.42		
C*03:04	B*40:02	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	-0.0439	-0.06	C*04:01	B*35:12	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	0.0672	0.75		
C*08:03	B*48:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.5884	1.25	C*04:01	B*35:12	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.0133	0.14		
Total				117	0.2504			C*04:01	B*35:12	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	0.0296	0.31		
Caucasian	C*07:02	B*07:02	DRB1*15:01	DQB1*06:02	7	0.0150	0.4478	2.62	C*01:02	B*35:43	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	0.1708	1.09	
	C*16:01	B*44:03	DRB1*07:01	DQB1*02:02	6	0.0128	0.7341	2.44	C*06:02	B*37:01	DRB1*01:03	DQB1*05:01	2	0.0043	0.6645	1.42	
	C*08:02	B*14:02	DRB1*01:02	DQB1*05:01	5	0.0107	0.4414	2.22	C*03:04	B*39:02	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	0.3604	1.28	
	C*06:02	B*13:02	DRB1*07:01	DQB1*02:02	4	0.0086	0.7873	1.99	C*07:02	B*39:02	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.4658	1.32	
	C*05:01	B*18:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	3	0.0064	0.5868	1.71	C*07:02	B*39:05	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	-0.4015	-0.85	
	C*07:01	B*57:01	DRB1*07:01	DQB1*03:03	3	0.0064	1.0000	1.74	C*07:02	B*39:06	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	0.0129	0.24	
	C*07:01	B*08:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	2	0.0043	0.6556	1.40	C*07:02	B*39:08	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.6241	1.33	
	C*12:03	B*38:01	DRB1*04:02	DQB1*03:02	2	0.0043	0.3188	1.37	C*12:03	B*39:10	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	1.0000	1.42	
	C*12:03	B*38:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	0.2909	1.24	C*03:04	B*40:02	DRB1*04:03	DQB1*03:02	2	0.0043	0.1807	1.30	
	C*05:01	B*44:02	DRB1*04:02	DQB1*03:02	2	0.0043	0.4891	1.40	C*03:04	B*40:02	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	0.0926	0.69	
	Total				36	0.0771			C*03:05	B*40:02	DRB1*14:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.1807	1.30	
	Caucasian shared with other populations	C*08:02	B*14:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	3	0.0064	0.7341	1.71	C*07:01	B*41:01	DRB1*08:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.42
C*07:01		B*49:01	DRB1*13:02	DQB1*06:04	3	0.0064	0.4902	1.72	C*06:02	B*45:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	1.0000	1.42	
C*04:01		B*35:01	DRB1*04:04	DQB1*03:02	3	0.0064	0.1472	1.28	C*07:02	B*51:01	DRB1*15:01	DQB1*06:02	2	0.0043	1.0000	1.42	
C*08:02		B*14:02	DRB1*03:01	DQB1*02:01	2	0.0043	0.1547	1.22	C*15:09	B*51:01	DRB1*04:11	DQB1*03:02	2	0.0043	0.2353	1.35	
C*04:01		B*35:01	DRB1*11:04	DQB1*03:01	2	0.0043	0.2252	1.29	C*15:09	B*51:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.0396	0.21	
C*04:01		B*35:01	DRB1*14:01	DQB1*05:03	2	0.0043	0.2252	1.29	C*03:03	B*52:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.1768	0.69	
C*07:02		B*07:02	DRB1*15:02	DQB1*06:01	2	0.0043	0.3788	1.35	Total				92	0.1975			
C*06:02		B*50:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	2	0.0043	0.4834	1.38									
Total				19	0.0407												

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t004

4.4. Extensión de los haplotipos conservados extendidos de HLA al gen *HLA-A*.

En la table 5 se muestran las asociaciones preferenciales entre los haplotipos *HLA-C/-B/-DRB1/-DQB1* comunes con alelos del gen *HLA-A* en la población mestizada mexicana muestreada. Es notable que los HEC se hayan encontrado con relativamente alta frecuencia en esta muestra, con cinco de ellos con **frecuencias haplotípicas ≥ 1.0 %**: A*24:02/C*07:02/B*39:06/DRB1*14:06/DQB1*03:01 (HF = 0.0256), A*02:01/C*04:01/B*35:17/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0150), A*68:03/C*07:02/B*39:05/DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.0107), A*02:06/C*07:02/B*39:05/DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.0107), y A*02:01/C*07:02/B*39:05/DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.0128), los primeros cuatro identificados previamente en muestras de poblaciones nativas americanas de todo el continente, y el último aún no reportado con anterioridad en ninguna población. También es importante señalar que se encontraron seis haplotipos de AMP europea y uno de AMP africana. Un grupo de 38 haplotipos se clasificaron como no previamente reportados (desconocidos), algunos de ellos resultado de la combinación de bloques nativos americanos con europeos. Interesantemente, un haplotipo comúnmente visto en análisis a población judía askenazi también se encontró presente en nuestra muestra: A*26:01/C*12:03/B*38:01/DRB1*04:02/DQB1*03:02.

Tabla 5: Extensión de los haplotipos extendidos conservados del sistema HLA al gen *HLA-A* en 234 individuos mexicanos (468 haplotipos).

A-C-B-DRB1-DQB1 haplotype					n	H.F.	Δ'	t	
Amerindian	A*24:02	C*07:02	B*39:06	DRB1*14:06	DQB1*03:01	12	0.0256	0.6992	2.76
	A*02:01	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	7	0.0150	0.3518	1.46
	A*68:03	C*07:02	B*39:05	DRB1*04:07	DQB1*03:02	5	0.0107	0.2834	2.02
	A*02:06	C*07:02	B*39:05	DRB1*04:07	DQB1*03:02	5	0.0107	0.1848	1.46
	A*02:01	C*04:01	B*35:12	DRB1*08:02	DQB1*04:02	4	0.0086	0.4444	1.21
	A*02:01	C*01:02	B*15:15	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.1898	0.68
	A*68:01	C*01:02	B*15:15	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.3214	1.38
	A*02:01	C*08:01	B*48:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.1898	0.68
	A*02:06	C*08:01	B*48:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.3085	1.31
	A*24:02	C*04:01	B*35:12	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.1407	0.58
	A*68:01	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.0693	0.64
	A*02:06	C*03:04	B*40:02	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.28
	A*02:06	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.5170	0.47
	A*02:01	C*03:04	B*39:02	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.10
	A*02:01	C*07:02	B*39:05	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.5679	0.93
	A*31:01	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.0693	0.64
Total					59	0.1263			
Caucasian	A*02:01	C*07:02	B*07:02	DRB1*15:01	DQB1*06:02	4	0.0086	0.4444	1.21
	A*30:02	C*05:01	B*18:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	3	0.0064	1.0000	1.72
	A*29:02	C*16:01	B*44:03	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	0.3158	1.32
	A*02:01	C*16:01	B*44:03	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	0.1357	0.45
	A*01:01	C*07:01	B*57:01	DRB1*07:01	DQB1*03:03	2	0.0043	0.6541	1.35
	A*33:01	C*08:02	B*14:02	DRB1*01:02	DQB1*05:01	2	0.0043	0.3922	1.38
Total					15	0.0322			
African	A*66:01	C*06:02	B*58:02	DRB1*13:01	DQB1*03:03	4	0.0086	1.0000	1.99
	Total				4	0.0086			
Unknown	A*02:01	C*07:02	B*39:05	DRB1*04:07	DQB1*03:02	6	0.0128	0.1130	0.68
	A*24:02	C*04:01	B*35:14	DRB1*16:02	DQB1*03:01	4	0.0086	1.0000	1.67
	A*30:01	C*06:02	B*13:02	DRB1*07:01	DQB1*02:02	4	0.0086	1.0000	1.99
	A*68:02	C*04:01	B*53:01	DRB1*13:02	DQB1*06:04	4	0.0086	1.0000	1.96
	A*02:01	C*01:02	B*15:30	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.6759	1.21
	A*23:01	C*07:01	B*41:01	DRB1*08:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.40
	A*66:01	C*12:03	B*39:10	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	1.0000	1.40
	A*26:01	C*06:02	B*37:01	DRB1*01:03	DQB1*05:01	2	0.0043	1.0000	1.39
	Table 5. Cont.								
	A*26:01	C*06:02	B*45:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	1.0000	1.39
	A*03:01	C*06:02	B*35:02	DRB1*11:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.38
	A*68:01	C*07:02	B*39:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.31
	A*68:01	C*07:02	B*39:02	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.31
	A*31:01	C*03:03	B*52:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.31
	A*02:06	C*01:02	B*15:30	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.28
	A*02:06	C*04:01	B*35:24	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.28
A*31:01	C*03:05	B*35:01	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.6381	1.25	
A*31:01	C*03:05	B*40:02	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	0.6381	1.25	
A*02:06	C*15:09	B*51:01	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.6312	1.22	
A*31:01	C*03:04	B*40:02	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.4571	1.20	
A*31:01	C*03:05	B*40:02	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.4571	1.20	
A*24:02	C*04:01	B*35:01	DRB1*14:01	DQB1*05:03	2	0.0043	1.0000	1.18	
A*24:02	C*04:01	B*35:12	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.18	
A*24:02	C*01:02	B*35:43	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.18	
A*24:02	C*03:04	B*40:02	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.18	
A*02:06	C*03:04	B*40:02	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.4468	1.15	
A*02:01	C*07:02	B*07:02	DRB1*11:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.10	
A*02:01	C*01:02	B*15:01	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.10	
A*02:01	C*01:02	B*35:43	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.10	
A*02:01	C*03:04	B*39:02	DRB1*04:11	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.10	
A*02:01	C*05:01	B*44:02	DRB1*04:02	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.10	
A*02:01	C*08:03	B*48:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.10	
A*02:01	C*15:09	B*51:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.10	
A*24:02	C*01:02	B*15:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.5990	1.06	
A*24:02	C*07:02	B*39:06	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.3985	0.94	
A*02:01	C*03:03	B*52:01	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	0.5679	0.93	
A*02:01	C*04:01	B*35:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.5679	0.93	
A*02:01	C*07:02	B*39:05	DRB1*14:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.5679	0.93	
A*24:02	C*07:02	B*39:05	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.2782	0.82	
Total					87	0.1869			

Blocks of each ancestry (Amerindian, Caucasian, Caucasian shared with other populations, African and Asian) were defined as those found in original populations with H.F. >1,0%, and not found in other native human groups in frequencies higher than 1,0%. We consider t value must be ≥ 2.0 to denote statistically significant association and thus validate Δ' (shaded values).
doi:10.1371/journal.pone.0074442.t005

4.5. La diversidad genética en el sistema HLA en la muestra de mexicanos.

Los datos estadísticos confirmaron que todos los loci del sistema HLA exhiben un elevado polimorfismo en esta muestra de mexicanos mestizados mediante los valores del contenido de información del polimorfismo (PIC por sus siglas en inglés) > 0.5. Los genes *HLA-B* y *-DRB1* fueron los más polimórficos con valores de 0.9544 y 0.9123, respectivamente. Los loci *HLA-C* y *-A* fueron relativamente menos polimórficos con valores de PIC de 0.8845 y 0.8776, mientras que el locus menos polimórfico fue *HLA-DQB1* (PIC = 0.8020). El grado de polimorfismo de los genes HLA también se confirma por los valores de PD. Un valor menor a lo esperado para la heterocigosidad se encontró para el locus *HLA-DRB1* locus (tabla 6).

Tabla 6: Medidas de diversidad genética a nivel alélico para el sistema HLA en una población mixta de México.

HLA Allele	O.H.	E.H.	p value	PIC	PD
<i>HLA-A</i>	0.8718	0.8919	0.5303	0.8776	0.7382
<i>HLA-B</i>	0.9487	0.9668	0.2942	0.9544	0.8531
<i>HLA-C</i>	0.9009	0.8947	0.2001	0.8845	0.7972
<i>HLA-DRB1</i>	0.9013	0.9193	0.0061	0.9123	0.7981
<i>HLA-DQB1</i>	0.8205	0.8256	0.2682	0.8020	0.6376

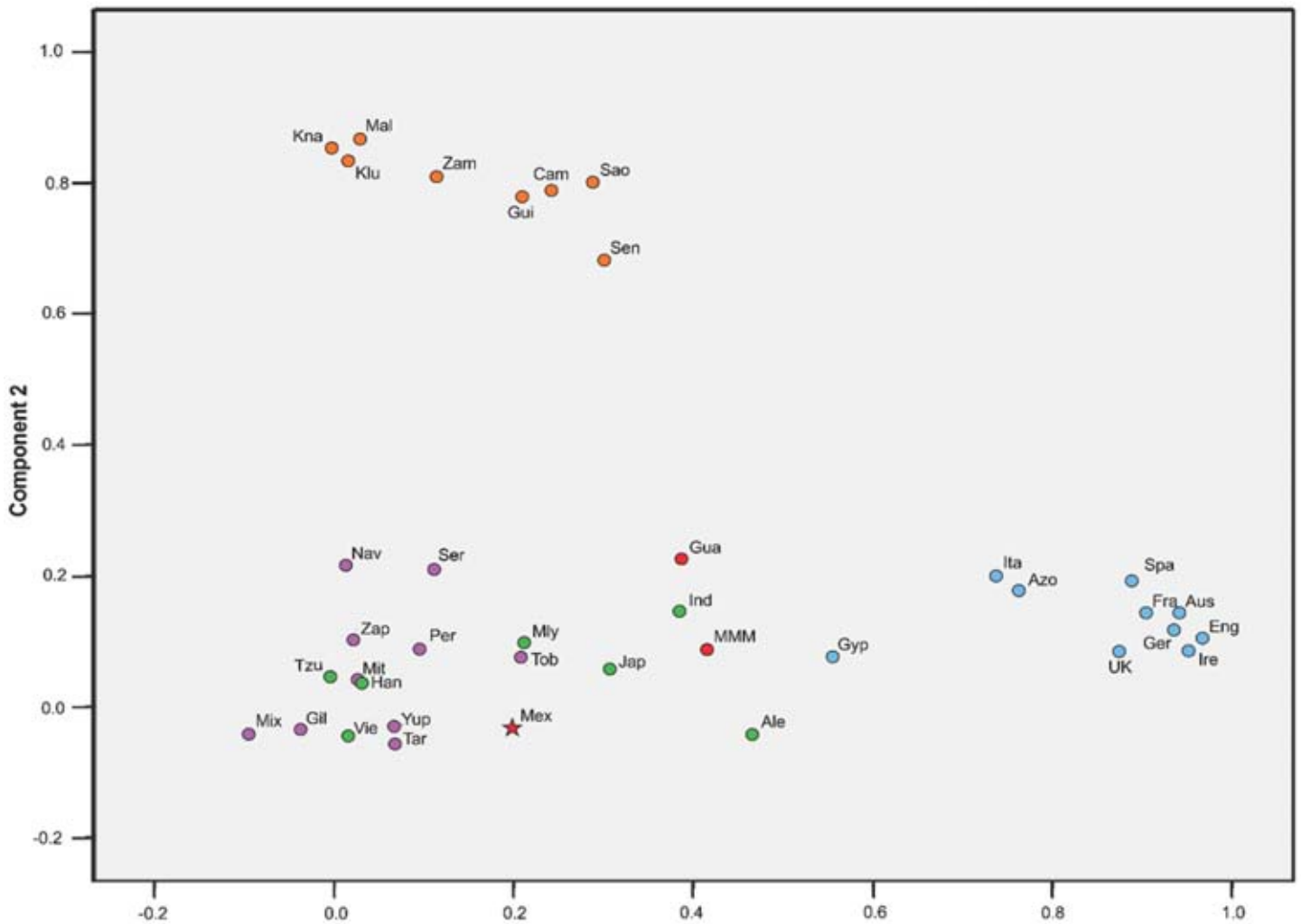
O.H.: Observed heterozygosity. E.H.: Expected Heterozygosity. *p* values <0.05 are considered statistically significant and thus reflect differences between O.H. and E.H. PIC: Polymorphism Information Contents. PD: Power of Discrimination.

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t006

4.6. Los individuos mexicanos mestizados tienen una proporción significativa de componentes genéticos nativo americano y europeo.

Las estimaciones de mestizaje mediante el empleo del gen *HLA-B* revelaron una contribución nativa americana de 59.97 %, contribución europea de 25.71 %, contribución africana de 14.13 % y contribución asiática de 0.18 %. Estos resultados fueron similares a las estimaciones obtenidas con el empleo de marcadores STRs: contribución nativa americana: 60.5 %, europea: 25.9 % y africana: 13.6 %. Adicionalmente, los resultados obtenidos mediante la técnica ABF revelaron una elevada frecuencia de bloques *HLA-C/-B* nativos americanos (41.3 %), seguida de bloques europeos (25.8 %), africanos (5.5 %) y asiáticos (3.3 %). El ABF de los bloques de HLA clase II fue: nativo americano (51.2 %), europeo (41.7 %), africano (3.4 %) y asiático (2.1 %). Mayor evidencia de estos datos pueden observarse en la gráfica del PCA (Figura 1), en la que estamuestra de mexicanos mestizados se agrupa junto con poblaciones nativas americanas y asiáticas (que no pudieron ser diferenciadas por medio de frecuencias alélicas del gen *HLA-B* como factor de análisis) y no con poblaciones europeas o africanas.

Figura 2: El análisis de componentes principales (PCA) revela una relación genética cercana de los individuos mexicanos mestizados de la Ciudad de México con los grupos nativos americanos.



Los puntos naranjas hacen referencia a poblaciones africanas. Los puntos azules representan las muestras europeas, mientras que los puntos verdes corresponden a grupos humanos asiáticos. Las poblaciones nativas americanas están representadas por los puntos púrpuras y las poblaciones mixtas están señaladas en rojo, con una estrella que indica la muestra analizada en el presente trabajo. Las referencias apropiadas para cada grupo poblacional están detalladas en la sección de Materiales y Métodos. Ire: Irlanda, Eng: Inglaterra, Ger: Alemania, Aus: Austria; Spa: España, Ita: Italia, UK: Reino Unido, Fra: Francia, Gyp: Gitanos de Bulgaria, Azo: Azores, Sao: São Tomé, Cam: Camerún, Mal: Mali, Zam: Zambia, KLu: Luo de Kenia, KNa: Nandi de Kenia, Sen: Senegal, Gui: Guinea Bissau, Ale: Aleutas de la Isla de Bering, Jap: Japón, Tzu: Taiwán, Han: Han del sur de China, Ind: Norte de India, Mly: Malasia, Vie: Vietnam, Tar: Tarahumaras, Gil: Nativo americanos del Río Gila, Yup: Yu'pik de Alaska, Mit: Mixtecos de Oaxaca, Zap: Zapotecos de Oaxaca, Mix: Mixe de Oaxaca, Ser: Seri de Sonora, Nav: Navajo de Nuevo México, Uro: Uro del Lago Titikaka, Perú, Tob: Toba de Rosario, Argentina, MMM: "Mexicanos mestizos", Gua: Guadalajara, Mex: este estudio.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la diversidad, ancestría y frecuencias de los bloques de HLA clase I (*HLA-C/-B*) y clase II (*HLA-DRB1/-DQB1*), de los HEC *HLA-C/-B/-DRB1/-DQB1* y su extensión al gen *HLA-A* en un total de 468 cromosomas analizados obtenidos a partir del estudio de individuos de la Ciudad de México. Se encontró que 41.0 % de los bloques *HLA-C/-B* en este grupo fueron de origen nativo americano. Adicionalmente, algunos de estos bloques *HLA-C/-B* también han sido descritos en poblaciones asiáticas (p. ej.: C*08:01/B*48:01) en los ivatan de Filipinas [Chu *et al.*, 2007] y varios grupos étnicos de Taiwán [González Galarza *et al.*, 2011]. Estos hallazgos podrían indicar que esos haplotipos pudieron ser frecuentes en un grupo ancestral del que tanto las poblaciones nativas americanas como las asiáticas (al menos las que habitan el este de Asia) de habrían generado. Los bloques nativos americanos HLA-C/-B observados en el presente trabajo han sido también reportados, con frecuencias relativamente elevadas, en grupos humanos que incluyen a los zapotecos, mixes y mixtecos del estado de Oaxaca en el sureste mexicano [Hollenbach *et al.*, 2001], tarahumaras del estado norteño de Chihuahua, México [García Ortíz *et al.*, 2006], grupos nativos del occidente de EEUU [Cao *et al.*, 2001] y yucpas de Venezuela [Layrisse *et al.*, 2001]. Las estimaciones genéticas de mestizaje no difieren de los datos previamente reportados con tipificación de HLA de resolución intermedia para la Ciudad de México [Barquera *et al.*, 2008]. Se detectó un 13.2 % de haplotipos de AMP europea y 11.1 % de haplotipos predominantemente europeos pero compartidos con otras poblaciones, incluyendo los haplotipos C*07:02/B*07:02, C*16:01/B*44:03, C*12:03/B*38:01 y C*05:01/B*18:01 [Yunis *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2001; Dunne *et al.*, 2008; Middleton *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2009].

En el PCA, la muestra analizada (Mex) se diferencia claramente de los *clusters* europeo y africano y se localiza en un grupo disperso que incluye poblaciones de Asia y algunos grupos nativos americanos. **Notablemente, la muestra de "mestizos" de México (MMM) y la muestra de Guadalajara (Gua) muestran mayor proximidad al componente europeo;** la población de Guadalajara ha mostrado una proporción de contribución genética europea importante en estudios previos tanto con genes del sistema HLA como con otros marcadores autosómicos [Leal *et al.*, 2005; Martínez Cortés *et al.*, 2013]. Las diferencias entre las poblaciones mestizas muestra la importancia de no tomar a los **"mestizos"** como una categoría de agrupamiento global o total para individuos o poblaciones con ancestría semejante derivada de una historia demográfica similar durante el periodo colonial. Así mismo, es evidente la falta de datos disponibles a nivel de alta resolución para el sistema HLA en más poblaciones nativas americanas, y el reducido número de individuos que típicamente se incluyen.

En lo tocante a los haplotipos de HLA de clase II, 51.2 % pueden asociarse a una ancestría nativa americana, con DRB1*08:02/DQB1*04:02 y DRB1*04:07/DQB1*03:02 como las asociaciones más comunes, mientras que cerca del 40 % de los bloques *HLA-DRB1/-DQB1* son de AMP europea. Estos haplotipos han sido encontrado con amplia representatividad en poblaciones nativas americanas de México, así como en los xavante de la región central de Brasil, los toba de Argentina, los athabaskan de Canadá y los mayas guatemaltecos [Cerna *et al.*, 1993; Fernández Viña *et al.*, 1997; Monsalve *et al.*, 1998; Gómez Casado *et al.*, 2003]. De manera interesante, los bloques de HLA de clase II muestran una diversidad restringida como lo señala el hecho de que once HEC ($HF > 0.5 \%$; $t \geq 2.0$) están asociados con únicamente tres bloques de HLA de clase II: DRB1*04:07/DQB1*03:02, DRB1*14:06/DQB1*03:01 y

principalmente DRB1*08:02/DQB1*04:02. Esta tendencia también se observa en los haplotipos completos *HLA-A/HEC*. Menos del 5 % de los bloques de clase II con ancestría probable africana o asiática pudieron ser detectados.

Los parámetros de diversidad genética confirman el alto grado de polimorfismo que los genes HLA exhiben en esta muestra. *HLA-B* y *HLA-DRB1*, seguidos por *HLA-C*, mostraron los valores más elevados de PIC y PD, lo que es congruente con los reportes que los sitúan como los genes más polimórficos del genoma humano. Empero, se pudo observar que para el gen *HLA-DRB1* existe una heterocigosidad menor a la esperada. Esto puede ser indicativo de que existen fuerzas selectivas que actúan sobre este gen en la población mexicana, así como en las poblaciones nativas americanas, todo ello derivado del hecho de lo restringida que resulta la diversidad a nivel de HLA clase II. También puede deberse a la cantidad limitada de diversidad alélica que los primeros pobladores del continente americano trajeron a este continente en su paso migratorio desde Asia hace 15 000 – 30 000 años [Erlich *et al.*, 1997; Tsuneto *et al.*, 2003; Sánchez Mazas *et al.*, 2011] y su posterior incorporación al acervo genético de los grupos mexicanos mestizados. La desviación de las expectativas neutras tiende a ocurrir por un exceso de heterocigotos; sin embargo, el exceso de homocigotos también ha sido reportado en este sistema [Sánchez Mazas *et al.*, 2011]. Los patrones de migración hacia la Ciudad de México en los últimos 60 años deben tenerse en cuenta para explicar adecuadamente el bajo número de individuos heterocigotos, ya que los inmigrantes representan una fuente importante de incorporación de alelos y haplotipos -principalmente característicos en poblaciones indígenas-, lo que modifica la diversidad alélica de la población receptora.

En este estudio las estimaciones de mestizaje a partir de STRs confirman una mayor contribución genética de grupos nativos

americanos y europeos y menor por parte de poblaciones africanas y asiáticas. Los resultados obtenidos mediante el análisis de ABF de clase I también demostraron una mayor contribución genética nativa americana (41.3 %), seguida por los bloques europeos (24.6 %), africanos (6.7 %) y asiáticos (3 %). Las estimaciones de ABF de clase II revelan que 51.2 % de los bloques son de AMP nativa americana y 40.4 % fueron de AMP europea. Estos hallazgos sugieren que el método ABF puede ser empleado para analizar la diversidad genética y la estructura genética ancestral de las poblaciones mixtas. Desde esta perspectiva, el mestizaje genético de los mexicanos resultaría de la mezcla de la diversidad genética originaria de las poblaciones nativas americanas con los españoles y otros grupos europeos que llegaron a México a principios del siglo XVI. El componente europeo consistió al principio en conquistadores y colonos de Andalucía, León, Extremadura y las Castillas, así como de Portugal y Génova. Los españoles se asentaron extensivamente por todo el virreinato de la Nueva España y una inmigración masiva de colonos comenzó en el siglo XVII y prevaleció hasta comienzos del siglo XIX. La presencia de bloques o haplotipos de AMP europea puede ser explicada por estas características demográficas históricas. La relativamente elevada frecuencia de haplotipos comunes europeos puede deberse al hecho de que se han estudiado una mayor cantidad de grupos humanos europeos en comparación con africanos y asiáticos, o simplemente ser reflejo de una diversidad genética menos entre los grupos europeos. Otra hipótesis es que el reemplazo poblacional, en conjunto con el colapso de los grupos nativos americanos debido a las enfermedades infecciosas [Marr & Kiracofe, 2000] y las guerras de conquista, podrían explicar la alta prevalencia de bloques genéticos de AMP europea en el contexto de las poblaciones mestizadas en México [Arrieta Bolaños *et al.*, 2012]. La contribución Africana, aunque sutil, es presente en los individuos mexicanos mestizados debido a la introducción de africanos esclavizados a la Nueva España

durante los primeros tres siglos de dominación colonial española. Todas las asociaciones específicas de poblaciones africanas presentes en este estudio se encuentran reportadas en poblaciones de África sub sahariana, principalmente del centro y occidente [Cao *et al.*, 2001; Spínola *et al.*, 2001; González Galarza *et al.*, 2011], las regiones de las cuales los individuos esclavizados eran extraídos por los comerciantes de esclavos [Cao *et al.*, 2001; Barquera & Acuña, 2012]. Por ejemplo, los bloques de clase I C*07:01/B*49:01, C*04:01/B*53:01, C*06:02/B*58:02, y de clase II DRB1*13:01/DQB1*03:03 y DRB1*08:04/DQB1*03:01 han sido previamente reportados en bandiagara de Mali, bantú de Congo, bioko de Guinea Ecuatorial, luo y nandi de Kenia, Lusaka de Zambia, ugandeses y kampala de Uganda, y yaoundé de Camerún [Cao *et al.*, 2001; de Pablo *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 2000; Renquin *et al.*, 2001; Kijak *et al.*, 2009] así como en población afrodescendiente residente en EEUU [Maiers *et al.*, 2007].

Por otro lado, la presencia de variantes genéticas asiáticas en las poblaciones mexicanas posiblemente resulta de la inmigración relativamente reciente de comerciantes e individuos esclavizados de China en viajes transpacíficos desde las costas orientales de Asia a las costas occidentales de México, con desembarcos principalmente en el puerto de Acapulco. Así, la ruta de la *Não de China* (el galleon de Manila) junto con la política de inversión extranjera promovida por el gobierno mexicano a finales del siglo XIX, ayudaron a la comunidad china a convertirse en la mayor comunidad no hispana en México para mediados de la década de 1920 [Hu-Dehart, 1995]. La contribución asiática a la conformación del acervo genético de México es modesta, principalmente debido a la baja tasa de mestizaje entre los inmigrantes asiáticos y los diversos grupos sociales mexicanos; empero, se encontraron asociaciones clásicamente encontradas en grupos humanos asiáticos tales como C*04:01/B*35:16

[Shankarkumar, 2004] y C*08:01/B*15:02 [Cao *et al.*, 2001; Monsalve *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2010]. Las estimaciones de mestizaje con el uso de distintos marcadores apoyan un modelo trihíbrido de ancestría nativa americana, europea y africana para la generación de un crisol genético mexicano; no obstante, en este estudio se pudo detectar un componente asiático minoritario en la muestra de la Ciudad de México.

Es un hecho conocido que la diversidad del sistema MHC y por extensión, del HLA, influye en la susceptibilidad o resistencia a una amplia variedad de desórdenes autoinmunes y enfermedades infecciosas causadas por virus, levaduras, bacterias y parásitos. Se ha sugerido que la selección mediada por patógenos puede explicar cómo se mantiene la diversidad del sistema HLA a nivel poblacional [Doherty & Zinkerganel, 1975; Jeffery & Bangham, 2000]. Sin embargo, el papel de la diversidad del MHC asociado al mestizaje entre diferentes grupos étnicos en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades autoinmunes o infecciosas aún no es claro. Más aún, estudios recientes [de Vries et al., 1979; Gilbert *et al.*, 1998; Penn *et al.*, 2002; Finch & Crimmins, 2004; Gluckman & Hanson, 2004; Prugnolle *et al.*, 2005; Fumagalli *et al.*, 2011; Sánchez Mazas *et al.*, 2012] sugieren que los genes que confieren susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes pueden permanecer con frecuencias relativamente elevadas en grupos humanos específicos porque principalmente confieren protección contra agentes infecciosos, el principal factor que conduce la selección e influye la adaptación de las poblaciones humanas a los ambientes locales. Son necesarios estudios funcionales para definir si la diversidad genética del HLA se encuentra influida por ambientes enriquecidos en patógenos. Los análisis de la diversidad del sistema HLA en el contexto de la riqueza de los patógenos han mostrado una correlación positiva entre la diversidad de alelos de HLA de clase I y la riqueza de patógenos en el

ambiente y una correlación negativa en la diversidad de clase II, particularmente con los loci asociados a *HLA-DQB1*, lo que sugiere que los genes de clase I y clase II tienen estrategias evolutivas distintas para conferir inmunidad contra los patógenos [Sánchez Mazas *et al.*, 2012]. En este contexto, la mayor diversidad existente en los genes HLA de clase I puede ser el resultado de una respuesta a las altas tasas de mutación de los patógenos intracelulares, particularmente virus. En contraste, la menor diversidad genética de los genes de clase II puede deberse a la fijación de algunos alelos que proveen una protección inmune efectiva contra patógenos extracelulares altamente prevalentes en poblaciones y ambientes específicos. En esta muestra analizada se encontraron elevadas proporciones de alelos que han sido asociados a la presencia de artritis reumatoide (RA) (DRB1*04:04, DRB1*14:02 y DRB1*01:02), a lupus sistémico eritematoso (SLE) (DRB1*03:01) y a esclerosis sistémica (SSc) (DRB1*11:04). Es posible que los alelos de HLA clase II asociados con autoinmunidad, así como aquellos encontrados en altas frecuencias en grupos nativos americanos, podrían mostrar frecuencias elevadas con respecto a otras poblaciones debido a procesos selectivos pasados sobre enfermedades infecciosas o parasitarias desarrolladas en ambientes distintos a los actuales y así explicar en parte la susceptibilidad al desarrollo de condiciones autoinmunes en las poblaciones actuales o sus características clínicas particulares en la población mexicana.

*CONCLUSIONES Y
PERSPECTIVAS*

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En resumen, los individuos mestizados mexicanos de la Ciudad de México poseen un importante componente genético nativo americano y europeo, visible al estudiar los bloques HLA de clase I (*HLA-C/-B*) y clase II (*HLA-DRB1/-DQB1*) y sus haplotipos extendidos conservados. Una frecuencia relativamente baja de bloques y HEC africanos y asiáticos pudo ser detectada. En línea con estos resultados, las estimaciones de mestizaje a partir del análisis de frecuencias del gen *HLA-B* y marcadores STRs revelaron una mayor proporción de ancestría nativa americana, seguida de la contribución europea y africana. La alta frecuencia de algunos haplotipos, particularmente de AMP nativa americana, puede ser el resultado de varios mecanismos posibles, entre los que destacan “cuellos de botella” poblacionales recientes, supresión de los mecanismos de recombinación, transmisión preferencial de determinadas asociaciones, y procesos sociales como la migración y el mestizaje, así como fuerzas evolutivas tales como la deriva génica y la selección natural. Estos hallazgos sugieren que el estudio del sistema HLA clase I y clase II, así como sus bloques y diversidad haplotípica, pueden ser útiles para la caracterización de la contribución genética ancestral en las poblaciones mixtas, así como un reconocimiento “a vista de pájaro” de la diversidad genética que subyace en una población al momento de efectuar estudios de asociación con enfermedades, para la elaboración de bases de datos de donadores, bancos de células troncales hematopoyéticas y el manejo más eficiente de los individuos en lista de espera de donación de órgano sólido - particularmente para la optimización del análisis de Anticuerpos anti-HLA Reactivos a Panel-. Las aproximaciones y estrategias empleadas en este trabajo pueden ser de gran utilidad para el estudio de poblaciones mixtas o mestizadas en distintas partes de América

Latina, región con una historia social y demográfica similar y en la que las cuatro raíces genéticas ancestrales aquí expuestas siguen una dinámica similar en lo general, pero con peculiaridades suficientes para justificar la generación de estudios más ambiciosos que incluyan más genes relevantes para la inmunogenética, con tamaños muestrales superiores y que cotejen y discutan los estudios hasta ahora realizados en el contexto de los hallazgos poblacionales efectuados. El peso que estas aseveraciones tengan deberá estar respaldado por los análisis previamente mencionados que busquen la relevancia funcional de esta diversidad, así como ensayos que pongan a prueba el papel de esta diversidad contra epítopes propios y no propios. Sólo así, la relevancia que adquiera este tipo de estudios podrá incorporarse a las políticas de salud desde unidades analíticas clásicas como la epidemiología, pero también evaluará su impacto en las más novedosas como la farmacogenómica, los estudios de asociación gen-enfermedad basados en estudios funcionales y modelaje *in silico*, y las técnicas de ingeniería de tejidos y regeneración celular.

REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA

7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Acuña Alonzo V. "La contribución genética africana a las poblaciones contemporáneas". 2005. Tesis de Licenciatura en Antropología Física. México, Escuela Nacional de Antropología e Historia.

Acuña Alonzo V, Barquera R, Granados J. "Una mirada al mestizo mexicano: ¿hay necesidad de replantear el concepto?". 2005. ponencia presentada en el XIII Coloquio Internacional de Antropología Física Juan Comas, Campeche.

Aguirre Beltrán G. *La población negra en México: Estudio etnohistórico*, 2da. ed., 1972. México. Fondo de Cultura Económica.

Alderete E. "Los pueblos indígenas en el contexto global", en: Alderete E (editora). *Conocimiento indígena y globalización*, 1ra. ed., 2005. Quito, Ecuador. Ediciones Abya-Yala.

Alfirevic A, Gonzalez-Galarza F, Bell C, Martinsson K, Platt V, et al. In silico analysis of HLA associations with drug-induced liver injury: use of a HLA-genotyped DNA archive from healthy volunteers. *Genome Med* (2012); 6: 51.

Arnaiz Villena A, Gonzalez-Alcos V, Serrano Vela JI, Reguera R, Barbolla L, et al. HLA genes in Uros from Titikaka Lake, Peru: origin and relationship with other Amerindians and worldwide populations. *Int J Immunogenet* (2009); 36: 159-167.

Arrieta-Bolaños E, Madrigal JA, Shaw BE. Human Leukocyte Antigen profiles of Latin American populations: differential admixture and its potential impact on hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Res* (2012); 2012: 136087.

Axtell J. The Columbian mosaic in colonial America. *Humanities* (1991); 12: 12-8.

Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, Acuña Alonzo V, Montoya Gama K, et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol* (2008); 45: 1171-1178.

Barquera R. El papel de la genética de poblaciones en la inmunología del trasplante en México. *Gac Méd Méx* (2012); 148: 52-67.

Barquera R, Acuña-Alonzo V. The African colonial migration into Mexico: History and biological consequences. En: Crawford MH & BC Campbell (ed.). *Causes and Consequences of Human Migration. An evolutionary perspective*. 2012. Cambridge University Press. pp. 201-223.

Barquera R, Acuña Alonzo V, López Gil C, Adalid Sáinz C, Vega Martínez MR, Juárez Nicolás F, et al. Una primera aproximación a la generación de un mapa inmunogenético de la población mexicana. *Est Antrop Biól* (2013); XVI: 415-430.

Barrot C, Sánchez C, Ortega M, González Martín A, Brand Casadevall C, et al. Characterisation of three Amerindian populations from Hidalgo State (Mexico) by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med* (2005); 119: 111-115.

Bryc K, Véléz C, Karafet T, Moreno Estrada A, Reynolds A, et al. Genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010); 107: pp. 8954-8961.

Buchenau J. Small numbers, great impact: Mexico and its migrants, 1821-1973. *J Am Ethn His* (2001); 20: 23-49.

Calzada P, Suárez I, García S, Barrot C, Sánchez C, et al. The Fang population of Equatorial Guinea characterized by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med* (2005); 119: 107-110.

Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, et al. 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* (2001); 62: 1009-30.

Cao K, Moormann AM, Lyke KE, Masaberg C, Sumba OP, Doumbo OK, et al. Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci. *Tissue Antigens* (2004); 63: 293-325.

Cerna M, Falco M, Friedman H, Raimondi E, Maccango A, et al. Differences in HLA class II alleles of isolated South American Indian populations from Brazil and Argentina. *Hum Immunol* (1993); 37: 213-220.

Chu CC, Trejaut J, Lee HL, Chang SL, Lin M. (2007) Ivatan from Bantanes, Philippines. Anthropology/human genetic diversity population reports. In: Hansen JA (ed) Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference, Volume I. Seattle: IHWG Press. pp. 611-615.

Cline SL. "Native peoples of colonial Central Mexico". En: Adams, Richard E. W. y Murdo J. MacLeod (eds.), *The Cambridge history of the native peoples of the Americas*, vol. II: Mesoamerica. 2008. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 187-222.

de Leo C, Castelan N, López M, González N, Weckmann AL, et al. HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican mestizos

established from serological typing of 50 families. *Hum Biol* (1997); 69: 809-818.

de Pablo R, García-Pacheco JM, Vilches C, Moreno ME, Sanz L, et al. HLA class I and class II allele distribution in the Bubi population from the island of Bioko (Equatorial Guinea). *Tissue Antigens* (1997); 50: 593-601.

de Vries RR, Meera Khan P, Bernini LF, van Loghem E, van Rood JJ. Genetic control of survival in epidemics. *J Immunogenet* (1979); 6: 271-287.

Díaz del Castillo B. *Historia verdadera de la conquista de la Nueva España*. 1575. Madrid. Emprenta del Reyno.

Doherty P, Zinkernagel R. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* (1975); 1: 1406-1409.

Dunne C, Crowley J, Hagan R, Rooney G, Lawlor E. HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 and DPB1 alleles and haplotypes in the genetically homogenous Irish population. *Int J Immunogenet* (2008); 35: 295-302.

Ellis JM, Mack SJ, Leke RF, Quakyi I, Johnson AH, et al. Diversity is demonstrated in class I HLA-A and HLA-B alleles in Cameroon, Africa: description of HLA-A*03012, *2612, *3006 and HLA-B*1403, *4016, *4703. *Tissue Antigens* (2000); 56: 291-302.

Erlich HA, Mack SJ, Bergström T, Gyllensten UB. HLA class II alleles in Amerindian populations: implications for the evolution of HLA polymorphism and the colonization of the Americas. *Hereditas* (1997); 127: 19-24.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* (2007); 1: 47-50.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* (2003); 164: 1567-1587.

Fernández Viña MA, Lázaro AM, Marcos CY, Nulf C, Raimondi E, et al. Dissimilar evolution of B-locus versus A-locus and class II of the HLA region in South American Indian tribes. *Tissue Antigens* (1997); 50: 233-250.

Fernández Viña MA, Hollenbach JA, Lyke KE, Sztein MB, Maiers M, et al. Tracking human migrations by the analysis of the distribution of HLA alleles, lineages and haplotypes in closed and open populations. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* (2012); 367: 820-829.

Finch CE, Crimmins EM. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science* (2004); 305: 1736-1739.

Frye D. "The native peoples of northeastern Mexico". En: Adams, Richard E. W. y Murdo J. MacLeod (eds.), *The Cambridge history of the native peoples of the Americas*, vol. II: Mesoamerica. 2008. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 89-135.

Fumagalli M, Sironi M, Pozzoli U, Ferrer-Admettla A, Pattini L, et al. Signatures of environmental genetic adaptation pinpoint pathogens as the main selective pressure through human evolution. *PLoS Genet* (2011); 7: e1002355.

García Ortíz JE, Sandoval Ramírez L, Rangel Villalobos H, Maldonado Torres H, Cox S, et al. High-resolution molecular characterization of the HLA class I and class II in the Tarahumara Amerindian population. *Tissue Antigens* (2006); 68: 135-46.

Gilbert SC, Plebanski M, Gupta S, Morris J, Cox M, et al. Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *Science* (1998); 279: 1173-1177.

Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* (2004); 305: 1733-1736.

Gómez Casado E, Martínez Laso J; Moscoso J, Zamora J, Martín Villa M, et al. Origin of Mayans according to HLA genes and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* (2003); 61: 425-436.

González Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Database issue* (2011); 39: D913-D919.

González Martín A, Gorostiza A, Rangel Villalobos H, Acunha V, Barrot C, et al. Analyzing the genetic structure of the Tepehua in relation to other neighbouring Mesoamerican populations. A study based on allele frequencies of STR markers. *Am J Hum Biol* (2008); 20: 605-613.

González Navarro M. *Los extranjeros en México y los mexicanos en el extranjero, 1821-1970*. Vol. 2. 1993. México. El Colegio de México.

Gorodezky C, Aláez C, Vázquez García MN, de la Rosa G, Infante E, et al. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol* (2001); 62: 979-91.

Greenberg JH, Turner II CG, Zegura SL, Campbell L, Fox JA, et al. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Current Anthropol* (1986); 27: 477-497.

Grunberg B. El universo de los conquistadores: resultado de una investigación prosopográfica. *Signos Históricos* (2004); 12: 94-118.

Haseman JK, Elston RC. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* (1972); 2: 3-19.

Hoang BK, Hang NT, Kashiwase K, Ohashi J, Lien LT, et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam. *Tissue Antigens* (2008); 71: 127-134.

Hollenbach JA, Thomson G, Cao K, Fernández Viña M, Erlich HA, et al. HLA diversity, differentiation, and haplotype evolution in Mesoamerican Natives. *Hum Immunol* (2001); 62: 378-90.

Hu-Dehart E. Coolies, Shopkeepers, Pioneers: The Chinese of Mexico and Peru, 1849-1930. *Amerasia J* (1989); 15: 91-116.

-----, "The Chinese of Peru, Cuba and México". En: Cohen, Robin (ed.), *The Cambridge survey of world migration*. 1995. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 220-391.

Infante E, Alaez C, Flores H, Gorodezky C. Seri from Sonora, Mexico. En: Hansen JA. *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference*. 2007. Seattle: IHWG Press, pp633-634.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. *La migración en Puebla. XII Censo General de Población y Vivienda 2000*. 2005. INEGI, Aguascalientes.

Jeffery KJ, Bangham CR. Do infectious diseases drive MHC diversity? *Microbes Infect* (2000); 2: 1335-1341.

Jinam TA, Saitou N, Edo J, Mahmood A, Phipps ME. Molecular analysis of HLA Class I and Class II genes in four indigenous Malaysian populations. *Tissue Antigens* (2010); 75: 151-158.

Jones GD. The native peoples of northeastern Mexico. En: Adams, Richard E. W. y Murdo J. MacLeod (eds.), *The Cambridge history of*

the native peoples of the Americas, vol. II: Mesoamerica. 2008. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 346-391.

Juárez Cedillo T, Zúñiga J, Acuña Alonzo V, Pérez Hernández N, Rodríguez Pérez JM, et al. Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int Genet* (2008) 2: e37-e39.

Kijak GH, Walsh AM, Koehler RN, Moquet N, Eller LA, et al. HLA class I allele and haplotype diversity in Ugandans supports the presence of major east African genetic cluster. *Tissue Antigens* (2009); 73: 262-269.

Layrisse Z, Guedez Y, Domínguez E, Paz N, Montagnani S, et al. Extended HLA haplotypes in a Carib Amerindian population: the Yucpa of the Perija Range. *Hum Immunol* (2001); 62: 992-1000.

Leal CA, Mendoza Carrera F, Rivas F, Rodriguez Reynoso S, Portilla de Buen E. *HLA-A* and *HLA-B* allele frequencies in a mestizo population from Guadalajara, Mexico, determined by sequence-based typing. *Tissue Antigens* (2005); 66: 666-673.

Lebedeva TV, Mastromarino SA, Lee E, Ohashi M, Alosco SM, Yu N. Resolution of HLA class I sequence-based typing ambiguities by group-specific sequencing primers. *Tissue Antigens* (2011); 77: 247-250.

Leffell MS, Fallin MD, Erlich HA, Fernandez-Viña M, Hildebrand WH, et al. HLA antigens, alleles and haplotypes among the Yup'ik Alaska natives: report of the ASHI Minority Workshops, Part II. *Hum Immunol* (2002); 63: 614-625.

Lisker R, Loria A, Córdova MS. Studies on several genetic hematological traits of the Mexican population. VIII. Hemoglobin S, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other

characteristics in a malarial region. *Am J Hum Genet* (1965); 17: 179-187.

Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* (2007); 13: 965-974.

Lovejoy PE. The volume of the Atlantic slave trade: a synthesis. *J Afric Hist* (1982); 23: 473-501.

Mack SJ, Crawford MH, Saha N, Jani AJ, Geyer LN, et al. North Indians from New Delhi, India. En: Hansen JA. *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference*. 2007. Seattle: IHWG Press, pp. 605-607.

Maiers M, Gragert L, Klitz W. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Hum Immunol* (2007); 68: 779-788.

Manning P. Migrations of Africans to the Americas: The impact on Africans, Africa, and the New World. *The History Teacher* (1993); 26: 279-296.

Marr JS, Kiracofe JB. Was the Huey Cocoliztli a haemorrhagic fever? *Med Hist* (2000); 44: 341-362.

Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, et al. An update to HLA nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplant* (2010); 45: 846-848.

Martínez MA, García JE, Fernández P. *Indígenas en zonas metropolitanas. La situación demográfica en México*. 2003. México, Consejo Nacional de Población (CONAPO), pp.155-164.

Martínez Cortés G, Salazar Flores J, Haro Guerrero J, Rubi Castellanos R, Velarde Félix JS, et al. Maternal admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on mtDNA haplogroups. *Am J Phys Anthropol* (2013); 151: 526-537.

Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, et al. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* (2000); 61: 1048-1052.

Monsalve MV, Edin G, Devine DV. Analysis of HLA class I and class II in Na-Dene and Amerindian populations from British Columbia, Canada. *Hum Immunol* (1998); 59: 48-55.

Montemayor Hernández A. *Historia de Monterrey.* 1971. Monterrey. Asociación de Editores de Monterrey.

Moscoso J, Crawford MH, Vicario JL, Zlojutro M, Serrano-Vela JI, et al. HLA genes of Aleutian Islanders living between Alaska (USA) and Kamchatka (Russia) suggest a possible southern Siberia origin. *Mol Immunol* (2008); 45: 1018-1026.

Novembre J, Han E. Human population structure and the adaptive response to pathogen-induced selection pressures. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* (2012); 367: 878-886.

Ortega Yáñez A. "Determinación de frecuencias alélicas y haplotípicas del sistema HLA en receptores y donadores en protocolo de trasplante renal y en protocolo de donador fallecido de la UMAE HE CMN SXXI del Servicio de Trasplantes y Nefrología de 2005 a 2011". 2012. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica. México, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Ortiz Hernández L, Delgado Sánchez G, Hernández Briones A. Cambios en factores relacionados con la transición alimentaria y nutricional en México. *Gac Méd Méx* (2006); 142: 181-193.

Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002); 99: 11260-11264.

Pingel J, Solloch UV, Hofmann JA, Lange V, Ehninger G, et al. High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: how can they be used to improve unrelated donor searches? *Hum Immunol* (2013); 74: 330-340.

Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guegan JF, Guernier V, et al. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Current Biology* (2005); 15: 1022-1027.

The PyMOL Molecular Graphics System, versión 1.2r3pre, Schrödinger, LLC [Software].

Rani R, Marcos C, Lazaro AM, Zhang Y, Stastny P. Molecular diversity of *HLA-A*, *-B* and *-C* alleles in a North Indian population as determined by PCR-SSOP. *Int J Immunogenet* (2007); 34: 201-208.

Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, et al. Reconstructing Native American population history. *Nature* (2012); 488: 370-374.

Renquin J, Sánchez Mazas A, Halle L, Rivalland S, Jaeger G, et al. HLA class II polymorphism in Aka Pygmies and Bantu Congolese and a reassessment of HLA-DRB1 African diversity. *Tissue Antigens* (2001); 58: 211-222.

Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* (2003); 31: 311-4.

Rosenmayr A, Pointner-Prager M, Winkler M, Mitterschiffthaler A, Pelzmann B, et al. The Austrian Bone Marrow Donor Registry:

Providing Patients in Austria with Unrelated Donors for Transplant - a Worldwide Cooperation. *Transfus Med Hemother* (2011); 5: 292-299.

Rubio B. Globalización, reestructuración productiva en la agricultura latinoamericana y vía campesina 1970-1995. *Cuadernos Agrarios* (1995); (nueva época) 17-18: 29-60.

Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M. Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. *Tissue Antigens* (2000); 56: 522-529.

Saldanha N, Spínola C, Santos MR, Simões JP, Bruges-Armas J, et al. HLA polymorphisms in Forros and Angolares from São Tomé Island (West Africa): Evidence for the Population Origin. *J Genet Genealogy* (2009); 5: 76-85.

Salzano FM. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Ciênc* (2002); 74: 223-263.

Sánchez-Mazas A, Steiner QG, Grundschober C, Tiercy JM. The molecular determination of *HLA-Cw* alleles in the Mandenka (West Africa) reveals a close genetic relationship between Africans and Europeans. *Tissue Antigens* (2000); 56: 303-312.

Sánchez Mazas A, Fernández Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, et al. Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology* (2011); 133: 143-164.

Sánchez Mazas A, Lemaître JF, Currat M. Distinct evolutionary strategies of human leukocyte antigen loci in pathogen-rich environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2012); 367: 830-839.

Sanz P, Prieto V, Flores I, Torres Y, López-Soto M, et al. Population data of 13 STRS in Southern Spain (Andalusia). *Forensic Sci Int* (2001); 119: 113-115.

Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, et al. Estimation of high-resolution *HLA-A, -B, -C, -DRB1* allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol* (2009); 11: 895-902.

Shankarkumar U. HLA-A, -B, and -Cw allele frequencies in a Parsi population from Western India. *Hum Immunol* (2004); 65: 992-993.

Shen CM, Zhu BF, Deng YJ, Ye SH, Yan JW, et al. Allele polymorphism and haplotype diversity of *HLA-A, -B* and *-DRB1* loci in sequence based typing for Chinese Uyghur ethnic group. *PLoS ONE* (2010); 5: e13458.

Shi L, Shi L, Yao YF, Matsushita M, Yu L, et al. Genetic link among Hani, Bulang, and other Southeast Asian populations: evidence from HLA *-A, -B, -C, -DRB1* genes and haplotypes distribution. *Int J Immunogenet* (2010); 37: 467-475.

Skellekens J, Rozemuller EH, Petersen EJ, van der Tweel JG, Verdonck LF, Tilanus MG. Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation. *Mol Immunol* (2008); 45: 2255-2261.

Spínola H, Brehm A, Williams F, Jesús J, Middleton D. Distribution of HLA alleles in Portugal and Cabo Verde. Relationships with the slave trade route. *Ann Hum Genet* (2002); 66: 285-96.

Spínola H, Brehm A, Bettencourt B, Middleton D, Bruges-Armas J. HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands. *Tissue Antigens* (2005); 66: 217-30.

Spínola H, Bruges Armas J, Middleton D, Brehm A. HLA polymorphisms in Cabo Verde and Guiné-Bissau inferred from sequence-based typing. *Hum Immunol* (2005); 66: 1082-1092.

Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, et al. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS ONE*, (2007); 2: e829.

Tereba A. Tools for analysis of population statistics. *Profiles DNA* (1999); 2: 3-5.

Torimiro JN, Carr JK, Wolfe ND, Karacki P, Martin MP, et al. HLA class I diversity among rural rainforest inhabitants in Cameroon: identification of A*2612-B*4407 haplotype. *Tissue Antigens* (2006); 67: 30-37.

Torres García D, Barquera R, Zúñiga J. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* (2008); 21: 57-65.

Tratchenberg E, Vinson M, Hayes E, Hsu YM, Houtchens K, et al. Southern Han Chinese from People's Republic of China. Anthropology/human genetic diversity population reports. En: Hansen JA. *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference*. 2007. Seattle: IHWG Press, pp. 616-617.

Tsuneto LT, Probst CM, Hutz MH, Salzano FM, Rodríguez-Delfín LA, et al. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. *Tissue Antigens* (2003); 62: 512-526.

United Nations Human Settlements Programme (UN-HABITAT) y Office of the High Commissioner for Human Rights (OHCHR). *Urban indigenous peoples and migration: a review of policies,*

programmes and practices. Reporte No. 8. 2010. Nairobi. United Nations Rights Programme.

Vansan Maragon A, Soares Guelsin GA, Chagas Rudnick CC, Alessio Franceschi DS, Laguila Visentainer JE, Sell AM. Receptores KIR de células Natural Killer. *Cienc Cuid Saude* (2008); 7 (Suplem. 1): 153-160.

Vargas Alarcón G, Granados J, Rodríguez Pérez JM, Parga C, Pérez Hernández N, et al. Distribution of HLA class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizo population: comparison with other populations. *Immunol Invest* (2010); 39: 268-83.

Wang J. Maximun likelihood estimation for admixture proportions from genetic data. *Genetics* (2003); 164: 747-765.

Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, et al. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* (2008); 4: e1000037.

Wen SH, Lai MJ, Yang KL. Human leukocyte antigen-A, -B, and -DRB1 haplotypes of cord blood units in the Tzu Chi Taiwan Cord Blood Bank. *Hum Immunol* (2008); 69: 430-436.

Williams R, Chen YF, Endres R, Middleton D, Trucco M, et al. Molecular variation at the *HLA-A, B, C, DRB1, DQA1*, and *DQB1 loci* in full heritage American Indians in Arizona: private haplotypes and their evolution. *Tissue Antigens* (2009); 74: 520-533.

Williams TM. Human Leukocyte Antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn* (2001); 3: 98-104.

Yan C, Wang R, Li J, Deng Y, Wu D, et al. *HLA-A* gene polymorphism defined by high-resolution sequence-based typing in 161 Northern Chinese Han people. *Genomics Proteomics Bioinformatics* (2003); 1: 304-309.

Yasuda N. HLA polymorphism information content (PIC). *Jinrui Idengaku Zasshi* (1988); 33: 385-387.

Yunis EJ, Larsen CE, Fernández Viña M, Awdeh ZL, Romero TT; et al. Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. *Tissue Antigens* (2003); 62: 1-20.

Yunis EJ, Zúñiga J, Larsen CE, Fernández Viña M, Granados J, et al. "Single Nucleotide Polymorphism block and haplotypes: Human MHC block diversity". En: Robert A. Meyers, *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, vol. 13, 2da. ed. 2005. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, pp. 191-215.

Zhu BF, Yang G, Shen CM, Qin HX, Liu SZ, et al. Distributions of HLA-A and -B alleles and haplotypes in the Yi ethnic minority of Yunnan, China: relationship with other populations. *J Zhejiang Univ Sci B* (2010); 11: 127-135.

ARTÍCULO

HLA Class I and Class II Conserved Extended Haplotypes and Their Fragments or Blocks in Mexicans: Implications for the Study of Genetic Diversity in Admixed Populations

Joaquín Zúñiga¹*, Neng Yu²*, Rodrigo Barquera³*, Sharon Alosco²*, Marina Ohashi², Tatiana Lebedeva², Víctor Acuña-Alonso³, María Yunis⁴, Julio Granados-Montiel⁵, Alfredo Cruz-Lagunas¹, Gilberto Vargas-Alarcón⁶, Tatiana S. Rodríguez-Reyna⁷, Marcelo Fernandez-Viña⁸, Julio Granados⁹*, Edmond J. Yunis⁴*

1 Department of Immunology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico, **2** HLA Laboratory, The American Red Cross Northeast Division, Dedham, Massachusetts, United States of America, **3** Molecular Genetics Laboratory, National School of Anthropology and History, Mexico City, Mexico, **4** Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America, **5** Tissue Engineering, Cell Therapy and Regenerative Medicine Research Unit, Instituto Nacional de Rehabilitación, Mexico City, Mexico, **6** Laboratory of Genomics, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez, Mexico City, Mexico, **7** Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, **8** Department of Pathology, Stanford University, Stanford, California, United States of America, **9** Department of Transplantation, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Abstract

Major histocompatibility complex (MHC) genes are highly polymorphic and informative in disease association, transplantation, and population genetics studies with particular importance in the understanding of human population diversity and evolution. The aim of this study was to describe the HLA diversity in Mexican admixed individuals. We studied the polymorphism of MHC class I (*HLA-A*, *-B*, *-C*), and class II (*HLA-DRB1*, *-DQB1*) genes using high-resolution sequence based typing (SBT) method and we structured the blocks and conserved extended haplotypes (CEHs) in 234 non-related admixed Mexican individuals (468 haplotypes) by a maximum likelihood method. We found that HLA blocks and CEHs are primarily from Amerindian and Caucasian origin, with smaller participation of African and recent Asian ancestry, demonstrating a great diversity of HLA blocks and CEHs in Mexicans from the central area of Mexico. We also analyzed the degree of admixture in this group using short tandem repeats (STRs) and *HLA-B* that correlated with the frequency of most probable ancestral *HLA-C/-B* and *-DRB1/-DQB1* blocks and CEHs. Our results contribute to the analysis of the diversity and ancestral contribution of HLA class I and HLA class II alleles and haplotypes of Mexican admixed individuals from Mexico City. This work will help as a reference to improve future studies in Mexicans regarding allotransplantation, immune responses and disease associations.

Citation: Zúñiga J, Yu N, Barquera R, Alosco S, Ohashi M, et al. (2013) HLA Class I and Class II Conserved Extended Haplotypes and Their Fragments or Blocks in Mexicans: Implications for the Study of Genetic Diversity in Admixed Populations. PLoS ONE 8(9): e74442. doi:10.1371/journal.pone.0074442

Editor: Jason D. Barbour, University of Hawaii Manoa, United States of America

Received: June 25, 2013; **Accepted:** July 31, 2013; **Published:** September 23, 2013

Copyright: © 2013 Zúñiga et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: No current external funding sources for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Edmond_yunis@dfci.harvard.edu (EJY); julgrate@yahoo.com (JG)

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

The human major histocompatibility complex (MHC) is located within chromosomal region 6p21.3 and spans at least 3.4 Mb of DNA containing as many as 420 genes, including the HLA system, other immune related genes and pseudogenes [1]. The extensive polymorphism of the HLA genes within populations could have resulted from selective pressures including functional adaptation particularly to bacteria, viruses and parasites [2–5]. Also, the hypothesis of heterozygote advantage proposed that individuals with heterozygosity at HLA loci would be more efficient to respond against pathogens in pathogen-enriched environments [6]. Nevertheless, studies of genetics of infectious diseases are

difficult to replicate due to the complex nature of the environmental factors and the degree of genetic diversity among human populations. In this regard, MHC genes are important because they are involved in immune responses, and are essential markers to study genetic diversity, disease susceptibility and allotransplantation [7].

Different studies using DNA polymorphic markers such as short tandem repeats (STRs), low and intermediate resolution HLA typing, ABO, MN and Rr-Hr blood groups, serum haptoglobin, albumin, and Factor Bf types have described the complexity of the genetic admixture of Mexican populations. These studies have revealed a non-homogeneous combination of Amerindian, Caucasian, and African genes in Mexican admixed individuals [8–10]. In

this context, an important role of ethnicity in the susceptibility to different inflammatory and infectious diseases has been attributable to the incorporation of MHC alleles by admixture with Caucasian, Asian and African populations [11].

An important aspect of the MHC genetics is the inheritance of non-random associated alleles known as linkage disequilibrium (LD) [12]. Extensive studies on the existence of small blocks and other relatively fixed genetic fragments within the human MHC have been conducted [7,13]. Specific DNA blocks with specific alleles of two or more MHC loci are often haplospecific for particular conserved extended haplotypes (CEHs). The frequency of CEHs and specific block combinations varies between major ethnic groups and/or in different geographic locations; these variations in the frequency of CEHs and blocks can be used as measurements of genetic diversity of the MHC [13]; however, little is known about the MHC blocks distribution and conserved haplotypes combination in Latin-American admixed human groups. Thus, the aim of the present study is to describe the distribution of HLA class I and class II blocks and the HLA CEHs using high resolution typing in a group of Mexican admixed individuals from Mexico City.

Results

HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 Allelic Frequencies in Mexican Admixed Individuals

The distribution of *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* and *-DQB1* alleles are listed in **Table 1**. We detected 34 *HLA-A*, 64 *HLA-B*, 28 *HLA-C*, 39 *HLA-DRB1*, and 15 *HLA-DQB1* alleles. The most frequent alleles were: **1) HLA-A:** A*02:01, A*24:02, A*02:06, A*68:01, and A*31:01; **2) HLA-B:** B*39:05, B*39:06, B*51:01, B*35:01, and B*40:02; **3) HLA-C:** C*07:02, C*04:01, C*01:02, C*03:04, C*06:02, and C*07:01; **4) HLA-DRB1:** DRB1*08:02, DRB1*04:07, DRB1*14:06, DRB1*07:01, DRB1*04:04, and DRB1*16:02 and **5) HLA-DQB1:** DQB1*03:01, DQB1*03:02, DQB1*04:02, DQB1*05:01, and DQB1*02:02 with frequencies higher than 5%. A significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was detected at the *HLA-DRB1* locus ($p < 0.05$).

Distribution of *HLA-C/-B* and *-DRB1/-DQB1* Blocks in Mexican Admixed Individuals

HLA-C/-B blocks found in this group of Mexican admixed individuals are grouped in **Table 2**. Twenty-six Amerindian (Native American) most probable ancestry (MPA) *HLA-C/-B* blocks (41.3%) were found. The most frequent (frequency $\geq 3.0\%$) Amerindian *HLA-C/-B* blocks were: C*07:02/B*39:05 (Haplotype Frequency (HF) = 0.0726), C*07:02/B*39:06 (HF = 0.0619), C*04:01/B*35:17 (HF = 0.0363), C*04:01/B*35:12 (HF = 0.0341) and C*08:01/B*48:01 (HF = 0.0320).

Eighteen *HLA-C/-B* blocks (13.2%) were of Caucasian MPA, the most frequent being: C*07:02/B*07:02 (HF = 0.0320), C*16:01/B*44:03 (HF = 0.0170), C*12:03/B*38:01 (HF = 0.0128), and C*05:01/B*18:01 (HF = 0.0106). The most common predominantly Caucasian *-C/-B* blocks shared with other ethnic groups were C*04:01/B*35:01 (HF = 0.0320), C*08:02/B*14:02 (HF = 0.0235), C*15:02/B*51:01 (HF = 0.0192), and C*06:02/B*13:02 (HF = 0.0106).

We also found 12 blocks (5.5%) from African MPA, being C*07:01/B*49:01 (HF = 0.0128), C*04:01/B*53:01 (HF = 0.0128) and C*06:02/B*58:02 (HF = 0.0128) were the most representative. Also 11 blocks (3.3%) of Asian MPA were found in our sample, all of them were uncommon, with frequencies below 1.0%. *HLA-C/B* blocks that were not previously reported numbered 57 (19.4%) –

including two haplotypes harboring *HLA-B* and *HLA-C* new alleles-, even though the vast majority of them did not reach frequencies above 1.0%. C*01:02/B*15:15 (HF = 0.0277), C*01:02/B*35:43 (HF = 0.0192), C*15:09/B*51:01 (HF = 0.0192), C*03:03/B*52:01 (HF = 0.0129) and C*04:01/B*35:14 (HF = 0.0128) were the main non-previously described *HLA-C/-B* associations.

The frequencies of *HLA-DRB1/-DQB1* blocks are summarized in **Table 3**. Eight *HLA-DRB1/-DQB1* blocks ($n = 240$ of 468, 51.2%) were from Amerindian MPA. The most frequent blocks were: DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.1902), DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.1153), DRB1*14:06/DQB1*03:01 (HF = 0.0983), DRB1*16:02/DQB1*03:01 (HF = 0.0641), and DRB1*14:02/DQB1*03:01 (HF = 0.0235). In addition, 10 Caucasian MPA and 19 predominantly Caucasian *HLA-DRB1/-DQB1* blocks were frequent in this sample. For example: DRB1*03:01/DQB1*02:01 (HF = 0.0320); DRB1*15:01/DQB1*06:02 (HF = 0.0320) and DRB1*04:02/DQB1*03:02 (HF = 0.0214) were the most frequent Caucasian MPA haplotypes in our group, while DRB1*04:04/DQB1*03:02 (HF = 0.0620); DRB1*07:01/DQB1*02:02 (HF = 0.0598); DRB1*01:02/DQB1*05:01 (HF = 0.0235) and DRB1*04:03/DQB1*03:02 (HF = 0.0214) were the most common blocks that are usually found in European populations. All these haplotypes exhibited significant LD with Δ' values higher than 0.85. We found 8 African and seven Asian MPA blocks with frequencies lower than 1.0%. Six *-DRB1/-DQB1* haplotypes not found in autochthonous populations [14], including one haplotype bearing DRB1*16:01 in association with a new DQB1*05 allele, are reported in our group. All the above mentioned *HLA-C/-B* (**Table 2**) and *HLA-DRB1/DQB1* (**Table 3**) blocks were in LD represented by significant Δ' values and were demonstrated to be statistically relevant as they have t values ≥ 2.0 and p values < 0.0005 .

Conserved Extended HLA Haplotypes

We listed known CEHs in **Table 4**. A total of 23 Amerindian, 10 Caucasian, 8 Caucasian-shared with other populations, 1 African, 1 Asian, and 37 not previously reported (unknown) *HLA-C/-B/-DRB1/-DQB1* haplotypes were found in our admixed Mexican sample. Amerindian CEHs with frequencies higher than 1.0% were C*07:02/B*39:05/DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.0406); C*07:02/B*39:06/DRB1*14:06/DQB1*03:01 (HF = 0.0342); C*04:01/B*35:17/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0299); C*01:02/B*15:15/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0171); C*08:01/B*48:01/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0171), and C*04:01/B*35:12/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.015). Caucasian MPA blocks with frequencies above 1.0% include: C*07:02/B*07:02/DRB1*15:01/DQB1*06:02 (HF = 0.0150), C*16:01/B*44:03/DRB1*07:01/DQB1*02:02 (HF = 0.0128); and C*08:02/B*14:02/DRB1*01:02/DQB1*05:01 (HF = 0.0107). Neither African, Asian, Caucasian-shared with other populations, nor not previously reported haplotypes were found in frequencies above 1.0%, except for haplotype C*07:02/B*39:05/DRB1*08:02/DQB1*04:02 (HF = 0.0107), although it appears not to be in LD. t value for this haplotype does not reach statistical significance. For the rest of the CEHs detected, t values were ≥ 2.0 .

Extension of Conserved Extended HLA Haplotypes to HLA-A

In **Table 5** we show the preferential association of the common *HLA-C/-B/-DRB1/-DQB1* CEH with *HLA-A* alleles in Mexican admixed population. It is remarkable that CEHs were common in this sample, with five haplotypes found with HF $\geq 1.0\%$: A*24:02/C*07:02/B*39:06/DRB1*14:06/DQB1*03:01 (HF = 0.0256), A*02:01/C*04:01/B*35:17/DRB1*08:02/

Table 1. Allelic frequencies of *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, and *-DQB1* in 234 Mexicans.

HLA-A	F	HLA-B	F	HLA-C	F	HLA-DRB1	F	HLA-DQB1	F
A*02:01	0.2286	B*39:05	0.0791	C*07:02	0.2073	DRB1*08:02	0.1944	DQB1*03:01	0.2479
A*24:02	0.1688	B*39:06	0.0684	C*04:01	0.1859	DRB1*04:07	0.1175	DQB1*03:02	0.2457
A*02:06	0.0962	B*51:01	0.0598	C*01:02	0.0897	DRB1*14:06	0.1004	DQB1*04:02	0.2051
A*68:01	0.0791	B*35:01	0.0577	C*03:04	0.0662	DRB1*07:01	0.0705	DQB1*05:01	0.0684
A*31:01	0.0791	B*40:02	0.0534	C*06:02	0.0598	DRB1*04:04	0.0662	DQB1*02:02	0.0598
A*01:01	0.0363	B*48:01	0.0427	C*07:01	0.0534	DRB1*16:02	0.0641	DQB1*06:02	0.0363
A*68:03	0.0342	B*07:02	0.0406	C*08:01	0.0470	DRB1*15:01	0.0363	DQB1*02:01	0.0321
A*03:01	0.0321	B*35:17	0.0385	C*08:02	0.0406	DRB1*03:01	0.0321	DQB1*03:03	0.0214
A*68:02	0.0299	B*35:12	0.0385	C*03:05	0.0342	DRB1*13:01	0.0256	DQB1*06:04	0.0214
A*29:02	0.0256	B*14:02	0.0321	C*03:03	0.0299	DRB1*01:02	0.0235	DQB1*05:03	0.0171
A*11:01	0.0214	B*15:15	0.0321	C*16:01	0.0256	DRB1*14:02	0.0235	DQB1*06:03	0.0150
A*26:01	0.0192	B*44:03	0.0278	C*12:03	0.0256	DRB1*04:03	0.0214	DQB1*06:01	0.0107
A*23:01	0.0171	B*52:01	0.0214	C*15:09	0.0235	DRB1*13:02	0.0214	DQB1*03:19	0.0107
A*02:05	0.0171	B*15:01	0.0214	C*05:01	0.0214	DRB1*04:02	0.0214	DQB1*05:02	0.0064
A*30:02	0.0150	B*39:02	0.0214	C*15:02	0.0192	DRB1*04:11	0.0192	DQB1*05:new [†]	0.0021
A*30:01	0.0128	B*35:43	0.0192	C*02:02	0.0128	DRB1*01:01	0.0192		
A*33:01	0.0128	B*49:01	0.0192	C*14:02	0.0085	DRB1*11:04	0.0171		
A*66:01	0.0128	B*18:01	0.0171	C*08:03	0.0085	DRB1*14:01	0.0171		
A*32:01	0.0085	B*15:30	0.0171	C*16:04	0.0043	DRB1*11:01	0.0128		
A*24:25	0.0064	B*57:01	0.0150	C*02:10	0.0043	DRB1*10:01	0.0128		
A*25:01	0.0064	B*35:14	0.0150	C*03:02	0.0043	DRB1*15:02	0.0107		
A*68:05	0.0064	B*13:02	0.0128	C*12:02	0.0043	DRB1*11:02	0.0085		
A*03:02	0.0064	B*53:01	0.0128	C*04:07	0.0043	DRB1*12:02	0.0064		
A*01:02	0.0043	B*38:01	0.0128	C*16:02	0.0021	DRB1*13:03	0.0064		
A*33:03	0.0043	B*58:02	0.0128	C*07:04	0.0021	DRB1*04:01	0.0064		
A*02:211	0.0021	B*39:01	0.0107	C*15:05	0.0021	DRB1*01:03	0.0064		
A*34:01	0.0021	B*40:05	0.0107	C*17:01	0.0021	DRB1*16:01	0.0043		
A*01:03	0.0021	B*35:03	0.0107	C*03:new [§]	0.0021	DRB1*04:10	0.0043		
A*34:02	0.0021	B*41:01	0.0107			DRB1*08:04	0.0043		
A*30:04	0.0021	B*44:02	0.0107			DRB1*12:01	0.0043		
A*74:01	0.0021	B*35:24	0.0085			DRB1*13:05	0.0021		
A*26:17	0.0021	B*37:01	0.0085			DRB1*04:05	0.0021		
A*02:02	0.0021	B*14:01	0.0085			DRB1*15:03	0.0021		
A*02:24	0.0021	B*50:01	0.0085			DRB1*08:03	0.0021		
		B*40:27	0.0085			DRB1*04:08	0.0021		
		B*55:01	0.0064			DRB1*03:02	0.0021		
		B*58:01	0.0064			DRB1*08:01	0.0021		
		B*45:01	0.0064			DRB1*09:01	0.0021		
		B*27:05	0.0064			DRB1*13:04	0.0021		
		B*08:01	0.0064						
		B*39:08	0.0064						
		B*35:08	0.0064						
		B*35:16	0.0064						
		B*15:17	0.0064						
		B*51:02	0.0043						
		B*15:02	0.0043						
		B*15:03	0.0043						
		B*39:10	0.0043						
		B*15:39	0.0043						

Table 1. Cont.

HLA-A	F	HLA-B	F	HLA-C	F	HLA-DRB1	F	HLA-DQB1	F
		B*15:31	0.0043						
		B*35:02	0.0043						
		B*40:04	0.0021						
		B*15:16	0.0021						
		B*40:20	0.0021						
		B*40:08	0.0021						
		B*15:18	0.0021						
		B*15:10	0.0021						
		B*57:03	0.0021						
		B*27:03	0.0021						
		B*07:14	0.0021						
		B*35:20	0.0021						
		B*56:01	0.0021						
		B*35:40N	0.0021						
		B*35:new*	0.0021						

*Similar to B*35:01 with a mutation at codon 207 ggc>tgc (Gly>Cys).

†Similar to C*03:04 with a mutation at codon 189 gtg>atg (Val>Met).

‡Similar to DQB1*05:02 with a silent mutation at codon 133 cgg>cga.

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t001

DQB1*04:02 (HF = 0.0150), A*68:03/C*07:02/B*39:05/DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.0107), A*02:06/C*07:02/B*39:05/DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.0107), and A*02:01/C*07:02/B*39:05/DRB1*04:07/DQB1*03:02 (HF = 0.0128), the first four of them being identified within samples of Native American people from all over the Americas, and the last one not found yet in other populations. Importantly, six Caucasian and one African CEHs were found. A set of 38 haplotypes was classified as not previously reported (unknown), some of them resulted from recombination between Caucasian and Amerindian blocks. Interestingly, one CEH which is frequent in Askenazi Jewish population was also observed in our sample (A*26:01/C*12:03/B*38:01/DRB1*04:02/DQB1*03:02).

HLA Genetic Diversity in Mexicans

The extensive polymorphism of the HLA loci in this group of Mexicans was confirmed using polymorphism information content (PIC) values >0.5. *HLA-B* and *-DRB1* loci were the most polymorphic with PIC values of 0.9544 and 0.9123, respectively. *HLA-C* and *-A* loci were relatively less polymorphic with PIC values of 0.8845 and 0.8776, respectively, and the less polymorphic locus was *HLA-DQB1* (PIC = 0.8020). The degree of polymorphism of HLA loci was also corroborated by the power of discrimination (PD) values. A lower observed heterozygosity (OH) than expected heterozygosity (EH) was found for *HLA-DRB1* locus, **Table 6**.

Mexican Admixed Individuals have a Significant Proportion of Amerindian and Caucasian Genetic Components

The admixture estimations using *HLA-B* revealed an Amerindian contribution of 59.97%; Caucasian contribution of 25.71%; African contribution of 14.13%; and Asian contribution of 0.18%. These results were similar to the estimations obtained using STRs: Amerindian contribution: 60.5%; Caucasian: 25.9% and African: 13.6%.

In addition, the results using the ABF revealed a frequency of Amerindian *HLA-C/-B* blocks of 41.3%, followed by Caucasian 25.8%, African 5.5% and Asian 3.3% blocks. The ABF of MHC class II blocks were as follows: Amerindian 51.2%, Caucasian 41.7%, African 3.4% and Asian 2.1%. Further evidence of the distribution of immunogenetic diversity can be observed in the principal component analysis (PCA) plot (**Figure 1**), in which our Mexican admixed sample (Mex) clusters together with Native American and Asian populations (which can not be clearly differentiated from each other when *HLA-B* frequencies are taken as the variable of the factor analysis), and not with the African or European clusters.

Discussion

Here, we analyzed MHC class I (*HLA-C/B*) and class II (*HLA-DRB1/DQB1*) blocks diversity, ancestry, and the frequency of CEHs from *HLA-C/B/DRB1/DQB1* and their extension to *HLA-A* in a total number of 468 haplotypes of individuals from Mexico City. We found that 41.0% of the *HLA-C/-B* blocks in our group were from Amerindian origin. In addition, some of these *HLA-C/-B* blocks also have been described in Asian populations (e.g: C*08:01/B*48:01) including Ivatan from Philippines [15] and several ethnic groups from Taiwan [14]. These findings may indicate that those haplotypes could be frequent in an ancestral group from which both Amerindians and South-East Asians originated from. Amerindian *HLA-C/-B* blocks observed in the present study, have been also reported, with high frequencies, among Amerindian groups including Zapotecs, Mixe, and Mixtec from Oaxaca State in the southeast of Mexico [16]; Tarahumara from Chihuahua State in the north of Mexico [17]; Native Americans from US [18]; and Yucpa from Venezuela [19]. Genetic admixture estimations were similar to those previously reported data from Mexico City [9]. We detected 13.2% of haplotypes of Caucasian MPA and 11.1% were predominantly Caucasian but shared with other populations including the

Table 2. Frequencies of *HLA-C-B* blocks in 234 admixed Mexican individuals (468 haplotypes).

	-C-B block		n	H.F.	Δ'	t		-C-B block		n	H.F.	Δ'	t	
Amerindian	C*07:02	B*39:05	34	0.0726	0.8975	6.36	Asian	C*04:01	B*35:16	3	0.0064	1.0000	1.80	
	C*07:02	B*39:06	29	0.0619	0.8025	5.40		C*14:02	B*51:01	3	0.0064	0.7339	1.71	
	C*04:01	B*35:17	17	0.0363	1.0000	4.43		C*08:01	B*15:02	2	0.0042	1.0000	1.42	
	C*04:01	B*35:12	16	0.0341	0.8632	4.14		C*07:04	B*15:18	1	0.0021	1.0000	1.00	
	C*08:01	B*48:01	15	0.0320	0.7376	4.02		C*03:03	B*35:01	1	0.0021	0.0141	0.19	
	C*03:04	B*40:02	11	0.0235	0.4196	3.20		C*01:02	B*35:01	1	0.0021	-0.5908	-1.21	
	C*03:05	B*40:02	10	0.0213	0.6045	3.19		C*12:03	B*35:03	1	0.0021	0.1788	0.90	
	C*01:02	B*15:30	8	0.0170	1.0000	2.92		C*07:02	B*40:02	1	0.0021	-0.8007	-2.17	
	C*01:02	B*15:01	7	0.0149	0.6701	2.61		C*04:01	B*40:05	1	0.0021	0.0154	0.06	
	C*03:04	B*39:02	5	0.0106	0.4642	2.13		C*01:02	B*55:01	1	0.0021	0.2670	0.79	
	B*35:01	C*03:05	5	0.0106	0.2700	1.98		C*03:02	B*58:01	1	0.0021	0.4967	1.00	
	C*04:01	B*35:03	4	0.0085	0.7538	1.93		Total		16	0.0338			
	C*04:01	B*35:24	4	0.0085	1.0000	2.10								
	C*07:02	B*39:01	4	0.0085	0.7471	1.93		Unknown	C*01:02	B*15:15	13	0.0277	0.8534	3.71
C*07:02	B*39:02	4	0.0085	0.2414	1.12	C*01:02	B*35:43		9	0.0192	1.0000	3.10		
C*03:04	B*40:05	3	0.0064	0.5714	1.66	C*15:09	B*51:01		9	0.0192	0.8065	3.06		
C*07:01	B*15:17	3	0.0064	1.0000	1.75	C*04:01	B*35:14		6	0.0128	1.0000	2.58		
C*07:02	B*39:08	3	0.0064	1.0000	1.83	C*03:03	B*52:01		6	0.0128	0.5876	2.47		
C*08:03	B*48:01	3	0.0064	0.7387	1.72	C*04:01	B*35:08		3	0.0064	1.0000	1.80		
C*02:02	B*27:05	2	0.0042	0.6623	1.41	C*03:04	B*40:27		3	0.0064	0.7321	1.71		
C*08:01	B*51:02	2	0.0042	1.0000	1.42	C*06:02	B*07:02		2	0.0042	0.0540	0.68		
C*07:02	B*35:01	1	0.0021	-0.8228	-2.37	C*08:01	B*14:01		2	0.0042	-1.0000	-1.28		
C*03:04	B*35:01	1	0.0021	-0.4456	-0.73	C*04:07	B*15:31		2	0.0042	1.0000	1.42		
C*03:05	B*39:06	1	0.0021	-0.0938	-0.10	C*03:03	B*15:39		2	0.0042	1.0000	1.42		
C*03:04	B*40:08	1	0.0021	1.0000	1.00	C*06:02	B*35:02		2	0.0042	1.0000	1.42		
C*03:04	B*51:01	1	0.0021	-0.4654	-0.79	C*07:02	B*51:01		2	0.0042	-0.6583	-1.85		
Total			194	0.4133			C*15:05		B*07:02	1	0.0021	1.0000	1.00	
							C*07:01	B*07:14	1	0.0021	1.0000	1.00		
Caucasian	C*07:02	B*07:02	15	0.0320	0.7893	3.91	C*03:03	B*13:02	1	0.0021	0.1407	0.85		
	C*16:01	B*44:03	8	0.0170	0.6571	2.89	C*05:01	B*14:02	1	0.0021	0.0699	0.70		
	C*12:03	B*38:01	6	0.0128	1.0000	2.50	C*08:03	B*14:02	1	0.0021	0.2249	0.90		
	C*05:01	B*18:01	5	0.0106	0.6167	2.26	C*02:10	B*14:02	1	0.0021	0.4833	0.97		
	C*05:01	B*44:02	4	0.0085	0.7956	2.03	C*03:03	B*15:01	1	0.0021	0.0720	0.72		
	C*06:02	B*50:01	4	0.0085	1.0000	2.04	C*08:02	B*15:03	1	0.0021	0.4787	0.96		
	C*07:01	B*08:01	3	0.0064	1.0000	1.75	C*03:02	B*15:10	1	0.0021	1.0000	1.00		
	C*06:02	B*37:01	3	0.0064	0.7339	1.71	C*04:01	B*15:15	1	0.0021	-0.6444	-1.31		
	C*04:01	B*44:03	3	0.0064	0.0533	0.34	C*07:02	B*15:15	1	0.0021	-0.6811	-1.43		
	C*03:04	B*15:01	2	0.0042	0.1427	1.00	C*08:02	B*18:01	1	0.0021	0.0876	0.70		
	C*12:03	B*18:01	2	0.0042	0.2301	1.32	C*01:02	B*27:05	1	0.0021	0.2670	0.79		
	C*04:01	B*39:06	2	0.0042	-0.6667	-1.94	C*16:01	B*35:01	1	0.0021	0.0267	0.31		
	C*06:02	B*57:01	2	0.0042	0.2398	1.19	C*15:09	B*35:01	1	0.0021	0.0347	0.37		
	C*02:02	B*14:02	1	0.0021	0.1388	0.84	C*07:01	B*35:01	1	0.0021	-0.3126	-0.43		
	C*17:01	B*41:01	1	0.0021	1.0000	1.00	C*03:03	B*35:12	1	0.0021	0.0340	0.47		
	C*07:01	B*51:01	1	0.0021	-0.3371	-0.48	C*07:02	B*35:12	1	0.0021	-0.7342	-1.71		
	C*04:01	B*56:01	1	0.0021	1.0000	1.04	C*04:01	B*35:20	1	0.0021	1.0000	1.04		
	C*07:02	B*57:01	1	0.0021	-0.3166	-0.41	C*15:09	B*35:40N	1	0.0021	1.0000	1.00		
	Total			64	0.1359			C*03:04	B*35:New*	1	0.0021	1.0000	1.00	
							C*03:03	B*37:01	1	0.0021	0.2267	0.91		

Table 2. Cont.

	-C-B block		n	H.F.	Δ'	t	-C-B block		n	H.F.	Δ'	t
Caucasian shared with other populations	C*04:01	B*35:01	15	0.0320	0.4530	3.23	C*03:04	B*39:01	1	0.0021	0.1427	0.71
	C*08:02	B*14:02	11	0.0235	0.7219	3.40	C*03:New [§]	B*39:02	1	0.0021	1.0000	1.00
	C*15:02	B*51:01	9	0.0192	1.0000	3.09	C*04:01	B*39:05	1	0.0021	-0.8559	-2.83
	C*07:01	B*49:01	6	0.0128	0.6477	2.45	C*01:02	B*39:05	1	0.0021	-0.7014	-1.75
	C*06:02	B*13:02	5	0.0106	0.8226	2.26	C*02:02	B*39:05	1	0.0021	0.0945	0.55
	C*08:02	B*14:01	4	0.0085	1.0000	2.04	C*03:04	B*39:06	1	0.0021	-0.5323	-0.99
	C*07:01	B*41:01	4	0.0085	0.7886	2.01	C*07:01	B*39:06	1	0.0021	-0.4200	-0.67
	C*12:02	B*52:01	2	0.0042	1.0000	1.42	C*04:01	B*40:02	1	0.0021	-0.7778	-2.06
	C*02:02	B*40:02	1	0.0021	0.1212	0.72	C*07:02	B*40:04	1	0.0021	1.0000	1.05
	C*03:03	B*55:01	1	0.0021	0.3126	0.94	C*07:02	B*40:05	1	0.0021	-0.0433	-0.04
Total			58	0.1235			C*03:04	B*40:20	1	0.0021	1.0000	1.00
African	C*04:01	B*53:01	6	0.0128	1.0000	2.58	C*16:04	B*44:02	1	0.0021	0.4946	0.99
	C*06:02	B*58:02	6	0.0128	1.0000	2.51	C*08:01	B*44:03	1	0.0021	0.0310	0.40
	C*07:01	B*57:01	3	0.0064	0.3960	1.62	C*16:02	B*44:03	1	0.0021	1.0000	1.00
	C*12:03	B*39:10	2	0.0042	1.0000	1.42	C*16:01	B*48:01	1	0.0021	0.0420	0.50
	C*06:02	B*45:01	2	0.0042	0.6453	1.38	C*08:02	B*48:01	1	0.0021	0.0100	0.18
	C*02:10	B*15:03	1	0.0021	0.4978	1.00	C*01:02	B*49:01	1	0.0021	0.0226	0.19
	C*14:02	B*15:16	1	0.0021	1.0000	1.00	C*06:02	B*49:01	1	0.0021	0.0540	0.47
	C*02:02	B*27:03	1	0.0021	1.0000	1.00	C*07:02	B*49:01	1	0.0021	-0.4685	-0.72
	C*16:01	B*45:01	1	0.0021	0.3156	0.95	C*08:02	B*51:01	1	0.0021	-0.1278	-0.14
	C*16:01	B*51:01	1	0.0021	0.0245	0.28	C*08:01	B*51:01	1	0.0021	-0.2468	-0.32
	C*07:01	B*57:03	1	0.0021	1.0000	1.00	C*16:04	B*52:01	1	0.0021	0.4890	0.98
	C*07:01	B*58:01	1	0.0021	0.2954	0.89	C*06:02	B*52:01	1	0.0021	0.0422	0.41
							C*04:01	B*55:01	1	0.0021	0.1795	0.49
Total			26	0.0551			C*0801	B*4027	1	0.0021	0.2127	0.85
							C*12:03	B*57:01	1	0.0021	0.1201	0.85
							C*04:01	B*58:01	1	0.0021	0.1795	0.49
						Total			110	0.2326		

Blocks of each ancestry (Amerindian, Caucasian, Caucasian shared with other populations, African, and Asian) were defined as those found in original populations with H.F. >1,0%, and not found in other native human groups in frequencies higher than 1,0%. We consider t value must be ≥ 2.0 to denote statistically significant association and thus validate Δ' (shaded values).

*Similar to B*35:01 with a mutation at codon 207 ggc>gtc (Gly>Cys).

§Similar to C*03:04 with a mutation at codon 189 gtg>atg (Val>Met).

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t002

haplotypes C*07:02/B*07:02, C*16:01/B*44:03, C*12:03/B*38:01 and C*05:01/B*18:01 [13,18,20,21,22].

In the PCA, our Mexican admixed sample (Mex) clearly separated from the European and African clusters and located within a loose cluster including populations from Asia and Native human groups from America. Notably, the "Mestizo" sample from Mexico (MMM) and the sample from Guadalajara (Gua) showed to be more proximate to the European cluster; Guadalajara population samples have shown a high degree of European genetic component in other works [23,24]. Differences in admixed populations show the importance of not taking "Mestizo" as a global grouping category for individuals or populations with shared ancestry derived from demographic history of the colonial period. Also, lack of available data with high resolution HLA typing is evident in Native American groups.

Regarding MHC class II blocks, 51.2% of them were from Amerindian MPA, the most common being DRB1*08:02/

DQB1*04:02 and DRB1*04:07/DQB1*03:02, whereas 40% of the $-DRB1/-DQB1$ blocks were from Caucasian MPA. These haplotypes are common in Mexican Amerindians, as well as in Xavante from Central Brazil, Toba from Argentina, Athabaskan from Canada, and Mayans from Guatemala [25–28]. Interestingly, HLA class II blocks show a restricted diversity as it was pointed out by the fact that eleven CEH (HF >0.5%; $t \geq 2.0$) are associated with only three HLA class II blocks: DRB1*04:07/DQB1*03:02, DRB1*14:06/DQB1*03:01, and mainly DRB1*08:02/DQB1*04:02. This trend is also shown in CEH extended to the *HLA-A* locus. Less than 5% of class II blocks from African or Asian probable ancestry were detected.

Genetic diversity parameters confirm the high degree of polymorphism of the HLA genes in the studied sample. *HLA-B* and *HLA-DRB1* were the most polymorphic loci according to PIC and PD values, followed by *HLA-C* locus. However, lower OH than EH was found for *HLA-DRB1* locus. This may indicate that

Table 3. Frequencies of *HLA-DRB1-DQB1* blocks in 234 Mexican admixed individuals (468 haplotypes).

	DRB1-DQB1 block		n	H.F.	Δ'	t		DRB1-DQB1 block		n	H.F.	Δ'	t		
Amerindian	DRB1*08:02	DQB1*04:02	89	0.1902	0.9723	12.33	African	DRB1*10:01	DQB1*05:01	5	0.0107	0.8211	2.24		
	DRB1*04:07	DQB1*03:02	54	0.1153	0.9518	8.51		DRB1*13:01	DQB1*03:03	4	0.0086	0.3942	1.96		
	DRB1*14:06	DQB1*03:01	46	0.0983	0.9717	7.88		DRB1*08:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.55		
	DRB1*16:02	DQB1*03:01	30	0.0641	1.0000	6.25		DRB1*03:02	DQB1*04:02	1	0.0022	1.0000	1.05		
	DRB1*14:02	DQB1*03:01	11	0.0235	1.0000	3.68		DRB1*12:01	DQB1*05:01	1	0.0022	0.4632	0.93		
	DRB1*04:11	DQB1*03:02	8	0.0171	0.8526	2.93		DRB1*13:01	DQB1*05:01	1	0.0022	0.0159	0.18		
	DRB1*04:10	DQB1*04:02	1	0.0022	0.3706	0.71		DRB1*13:04	DQB1*03:01	1	0.0022	1.0000	1.10		
	DRB1*04:11	DQB1*04:02	1	0.0022	-0.4595	-0.70		DRB1*15:03	DQB1*06:02	1	0.0022	1.0000	1.00		
Total			240	0.5129			Total			16	0.0346				
Caucasian	DRB1*03:01	DQB1*02:01	15	0.0320	1.0000	4.02	Asian	DRB1*11:02	DQB1*03:01	3	0.0064	0.6674	1.60		
	DRB1*15:01	DQB1*06:02	15	0.0320	0.8779	4.01		DRB1*04:04	DQB1*04:02	2	0.0043	-0.6862	-2.03		
	DRB1*04:02	DQB1*03:02	10	0.0214	1.0000	3.50		DRB1*09:01	DQB1*03:03	1	0.0022	1.0000	1.00		
	DRB1*11:04	DQB1*03:01	8	0.0171	1.0000	3.13		DRB1*12:01	DQB1*03:01	1	0.0022	0.3348	0.63		
	DRB1*13:01	DQB1*06:03	6	0.0128	1.0000	2.49		DRB1*13:01	DQB1*06:02	1	0.0022	0.0487	0.59		
	DRB1*07:01	DQB1*03:03	5	0.0107	0.4620	2.10		DRB1*13:02	DQB1*05:01	1	0.0022	0.0338	0.33		
	DRB1*04:01	DQB1*03:02	3	0.0064	1.0000	1.90		DRB1*15:01	DQB1*05:01	1	0.0022	-0.1415	-0.16		
	DRB1*11:01	DQB1*03:01	2	0.0043	0.1130	0.40									
	DRB1*04:07	DQB1*03:01	1	0.0022	-0.9268	-3.80		Total				10	0.0217		
	DRB1*08:03	DQB1*03:01	1	0.0022	1.0000	-0.60									
Total			66	0.1411											
Caucasian shared with other populations	DRB1*04:04	DQB1*03:02	29	0.0620	0.9144	5.92	DRB1*04:07	DQB1*06:04	1	0.0022	-0.1509	-0.17			
	DRB1*07:01	DQB1*02:02	28	0.0598	1.0000	5.66	DRB1*10:01	DQB1*05:02	1	0.0022	0.3247	0.98			
	DRB1*01:02	DQB1*05:01	11	0.0235	1.0000	3.41	DRB1*11:02	DQB1*03:19	1	0.0022	0.2419	0.98			
	DRB1*04:03	DQB1*03:02	10	0.0214	1.0000	3.50	DRB1*14:06	DQB1*04:02	1	0.0022	-0.8965	-3.37			
	DRB1*01:01	DQB1*05:01	9	0.0192	1.0000	3.07	DRB1*16:01	DQB1*05:New [†]	1	0.0022	1.0000	1.00			
	DRB1*13:02	DQB1*06:04	9	0.0192	0.8978	3.07	Total				7	0.0153			
	DRB1*14:01	DQB1*05:03	8	0.0171	1.0000	2.89									
	DRB1*15:02	DQB1*06:01	5	0.0107	1.0000	2.27									
	DRB1*11:01	DQB1*03:19	4	0.0086	0.7974	2.02									
	DRB1*01:03	DQB1*05:01	3	0.0064	1.0000	1.75									
	DRB1*12:02	DQB1*03:01	3	0.0064	1.0000	1.90									
	DRB1*13:03	DQB1*03:01	3	0.0064	1.0000	1.90									
	DRB1*04:05	DQB1*03:02	1	0.0022	1.0000	1.09									
	DRB1*04:08	DQB1*03:01	1	0.0022	1.0000	1.10									
	DRB1*04:10	DQB1*03:02	1	0.0022	0.3366	0.63									
	DRB1*08:01	DQB1*04:02	1	0.0022	1.0000	1.05									
	DRB1*13:05	DQB1*03:01	1	0.0022	1.0000	1.10									
	DRB1*15:01	DQB1*05:02	1	0.0022	0.3081	0.93									
	DRB1*16:01	DQB1*05:02	1	0.0022	0.4968	1.00									
	Total			129	0.2761										

Blocks of each ancestry (Amerindian, Caucasian, Caucasian shared with other populations, African and Asian) were defined as those found in original populations with H.F. >1,0%, and not found in other native human groups in frequencies higher than 1,0%. We consider *t* value must be ≥ 2.0 to denote statistically significant association and thus validate Δ' (shaded values).[†] Similar to DQB1*05:02 with a silent mutation at codon 133 cgg>cga.
doi:10.1371/journal.pone.0074442.t003

selective forces are acting on the *HLA-DRB1* locus in Mexicans, as well as in the Mexican Amerindian populations, resulting in low class II diversity. Also, low class II diversity may have been produced by the limited *-DRB1* allelic diversity that the first

human settlers carried with them into the Americas [29–31] and their incorporation into the admixed Mexican genetic pool. Deviation from neutral expectations tends to occur by an excess of heterozygotes; however, homozygous excess has also been

Table 4. HLA Conserved Extended Haplotypes in 234 Mexican admixed individuals (468 haplotypes).

C-B-DRB1-DQB1 haplotype		n	H.F.	Δ'	t	C-B-DRB1-DQB1 haplotype		n	H.F.	Δ'	t
Amerindian	C*07:02 B*39:05 DRB1*04:07 DQB1*03:02	19	0.0406	0.5025	4.15	African	C*06:02 B*58:02 DRB1*13:01 DQB1*03:03	4	0.0086	1.0000	2.02
	C*07:02 B*39:06 DRB1*14:06 DQB1*03:01	16	0.0342	0.5482	3.89	Total		4	0.0086		
	C*04:01 B*35:17 DRB1*08:02 DQB1*04:02	14	0.0299	0.7256	3.64	Asian	C*08:01 B*15:02 DRB1*12:02 DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.42
	C*01:02 B*15:15 DRB1*08:02 DQB1*04:02	8	0.0171	0.5251	2.45	Total		2	0.0043		
	C*08:01 B*48:01 DRB1*08:02 DQB1*04:02	8	0.0171	1.0000	2.23	Unknown	C*07:02 B*39:05 DRB1*08:02 DQB1*04:02	5	0.0107	-0.2267	-0.14
	C*04:01 B*35:12 DRB1*08:02 DQB1*04:02	7	0.0150	0.3054	1.78		C*04:01 B*53:01 DRB1*13:02 DQB1*06:04	4	0.0086	0.6601	2.01
	C*01:02 B*15:30 DRB1*08:02 DQB1*04:02	4	0.0086	0.3826	1.49		C*04:01 B*35:14 DRB1*16:02 DQB1*03:01	4	0.0086	0.6438	1.95
	C*03:05 B*40:02 DRB1*04:07 DQB1*03:02	4	0.0086	0.3234	1.61		C*01:02 B*35:43 DRB1*04:03 DQB1*03:02	4	0.0086	0.4323	1.98
	C*15:02 B*51:01 DRB1*08:02 DQB1*04:02	4	0.0086	0.3140	1.36		C*03:04 B*40:02 DRB1*16:02 DQB1*03:01	4	0.0086	0.3200	1.78
	C*03:05 B*35:01 DRB1*04:07 DQB1*03:02	3	0.0064	0.5489	1.59		C*07:02 B*39:06 DRB1*04:07 DQB1*03:02	4	0.0086	0.0394	-0.66
	C*04:01 B*35:17 DRB1*16:02 DQB1*03:01	3	0.0064	0.1096	1.14		C*01:02 B*15:01 DRB1*08:02 DQB1*04:02	3	0.0064	0.2944	1.13
	C*07:02 B*39:05 DRB1*16:02 DQB1*03:01	3	0.0064	0.0295	0.49		C*04:01 B*35:01 DRB1*08:02 DQB1*04:02	3	0.0064	0.0121	0.09
	C*03:05 B*40:02 DRB1*04:04 DQB1*03:02	3	0.0064	0.2538	1.48		C*07:02 B*39:05 DRB1*14:02 DQB1*03:01	3	0.0064	0.2158	1.37
	C*03:03 B*52:01 DRB1*14:06 DQB1*03:01	3	0.0064	0.4455	1.55		C*08:01 B*48:01 DRB1*04:04 DQB1*03:02	3	0.0064	0.1472	1.28
	C*01:02 B*15:01 DRB1*16:02 DQB1*03:01	2	0.0043	0.2368	1.17		C*15:09 B*51:01 DRB1*04:07 DQB1*03:02	3	0.0064	0.2482	1.27
	C*01:02 B*15:30 DRB1*14:06 DQB1*03:01	2	0.0043	0.1682	0.93		C*07:02 B*07:02 DRB1*11:04 DQB1*03:01	2	0.0043	0.2235	1.28
	C*04:01 B*35:24 DRB1*16:02 DQB1*03:01	2	0.0043	0.4658	1.32		C*01:02 B*15:01 DRB1*04:04 DQB1*03:02	2	0.0043	0.2385	1.18
	C*01:02 B*35:43 DRB1*08:02 DQB1*04:02	2	0.0043	0.0396	0.21		C*04:07 B*15:31 DRB1*14:01 DQB1*05:03	2	0.0043	1.0000	1.42
	C*07:02 B*39:01 DRB1*08:02 DQB1*04:02	2	0.0043	0.3826	1.05		C*05:01 B*18:01 DRB1*11:01 DQB1*03:19	2	0.0043	0.4946	1.41
	C*03:04 B*39:02 DRB1*04:11 DQB1*03:02	2	0.0043	0.3896	1.39		C*04:01 B*35:01 DRB1*16:02 DQB1*03:01	2	0.0043	0.0740	0.77
	C*07:02 B*39:02 DRB1*08:02 DQB1*04:02	2	0.0043	0.3826	1.05		C*06:02 B*35:02 DRB1*11:04 DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.42
	C*03:04 B*40:02 DRB1*08:02 DQB1*04:02	2	0.0043	-0.0439	-0.06		C*04:01 B*35:12 DRB1*04:04 DQB1*03:02	2	0.0043	0.0672	0.75
	C*08:03 B*48:01 DRB1*08:02 DQB1*04:02	2	0.0043	0.5884	1.25		C*04:01 B*35:12 DRB1*04:07 DQB1*03:02	2	0.0043	0.0133	0.14
Total		117	0.2504				C*04:01 B*35:12 DRB1*14:06 DQB1*03:01	2	0.0043	0.0296	0.31
Caucasian	C*07:02 B*07:02 DRB1*15:01 DQB1*06:02	7	0.0150	0.4478	2.62		C*01:02 B*35:43 DRB1*04:04 DQB1*03:02	2	0.0043	0.1708	1.09
	C*16:01 B*44:03 DRB1*07:01 DQB1*02:02	6	0.0128	0.7341	2.44		C*06:02 B*37:01 DRB1*01:03 DQB1*05:01	2	0.0043	0.6645	1.42
	C*08:02 B*14:02 DRB1*01:02 DQB1*05:01	5	0.0107	0.4414	2.22		C*03:04 B*39:02 DRB1*04:04 DQB1*03:02	2	0.0043	0.3604	1.28
	C*06:02 B*13:02 DRB1*07:01 DQB1*02:02	4	0.0086	0.7873	1.99		C*07:02 B*39:02 DRB1*16:02 DQB1*03:01	2	0.0043	0.4658	1.32
	C*05:01 B*18:01 DRB1*03:01 DQB1*02:01	3	0.0064	0.5868	1.71		C*07:02 B*39:05 DRB1*14:06 DQB1*03:01	2	0.0043	-0.4015	-0.85
	C*07:01 B*57:01 DRB1*07:01 DQB1*03:03	3	0.0064	1.0000	1.74		C*07:02 B*39:06 DRB1*04:04 DQB1*03:02	2	0.0043	0.0129	0.24
	C*07:01 B*08:01 DRB1*03:01 DQB1*02:01	2	0.0043	0.6556	1.40		C*07:02 B*39:08 DRB1*04:07 DQB1*03:02	2	0.0043	0.6241	1.33
	C*12:03 B*38:01 DRB1*04:02 DQB1*03:02	2	0.0043	0.3188	1.37		C*12:03 B*39:10 DRB1*07:01 DQB1*02:02	2	0.0043	1.0000	1.42
	C*12:03 B*38:01 DRB1*07:01 DQB1*02:02	2	0.0043	0.2909	1.24		C*03:04 B*40:02 DRB1*04:03 DQB1*03:02	2	0.0043	0.1807	1.30
	C*05:01 B*44:02 DRB1*04:02 DQB1*03:02	2	0.0043	0.4891	1.40		C*03:04 B*40:02 DRB1*14:06 DQB1*03:01	2	0.0043	0.0926	0.69
							C*03:05 B*40:02 DRB1*14:02 DQB1*03:01	2	0.0043	0.1807	1.30

Table 4. Cont.

	C-B-DRB1-DQB1 haplotype				C-B-DRB1-DQB1 haplotype			
	n	H.F.	Δ'	t	n	H.F.	Δ'	t
Total	36	0.0771						
Caucasian shared with other populations	3	0.0064	0.7341	1.71				
	C*08:02 B*14:01 DRB1*07:01 QDB1*02:02				C*07:01 B*41:01 DRB1*08:04 DQB1*03:01			
	C*07:01 B*49:01 DRB1*13:02 DQB1*06:04	3	0.0064	0.4902	1.72			1.35
	C*04:01 B*35:01 DRB1*04:04 DQB1*03:02	3	0.0064	0.1472	1.28			0.21
	C*08:02 B*14:02 DRB1*03:01 DQB1*02:01	2	0.0043	0.1547	1.22			0.69
	C*04:01 B*35:01 DRB1*11:04 DQB1*03:01	2	0.0043	0.2252	1.29			
	C*04:01 B*35:01 DRB1*14:01 DQB1*05:03	2	0.0043	0.2252	1.29			
	C*07:02 B*07:02 DRB1*15:02 DQB1*06:01	2	0.0043	0.3788	1.35			
	C*06:02 B*50:01 DRB1*03:01 DQB1*02:01	2	0.0043	0.4834	1.38			
Total	19	0.0407			92	0.1975		

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t004

observed [31]. Migration patterns into Mexico City in the last 60 years also have to be taken into account to adequately address an explanation for the low number of heterozygous individuals, as they represent an important source of incorporation of alleles and haplotypes—mainly from indigenous populations—, hence modifying the allelic diversity.

In our study the admixture estimations using STRs confirm the greater contribution of Amerindian and Caucasian and a small contribution of African and Asian genes. The results obtained using the ABF of *HLA-C/-B* blocks also demonstrated a greater contribution of Amerindian (41.3%), followed by Caucasian (24.6%), African (6.7%), and Asian (3.0%) genes in the admixed Mexicans. Also, the estimations using the ABF of MHC class II blocks revealed that 51.2% of them were from Amerindian and 40.4% from Caucasian MPA. These findings suggest that ABF method is applicable to analyze the genetic diversity and ancestral structure of admixed populations. In this perspective, the genetic admixture of Mexicans could have resulted from the Spaniards, which arrived to Mexico early in the 16th century. Caucasian component consisted in conquerors and colonizers from Andalucía, Leon, Extremadura, and the Castillas, as well as Portugal and Genoa. Spaniards settled extensively all over the Viceroyalty of the New Spain and a massive migration of colonizers began on the 17th century and prevailed through the next two centuries. Presence of Caucasian-MPA or Caucasian-shared blocks or haplotypes may be explained by these demographic traits. The preponderance of haplotypes commonly found in Caucasian populations may be due to the fact that more Caucasian human groups than African or Asian ones have been studied, or may simply reflect a lower genetic diversity among Caucasians. Another hypothesis is that population replacement, together with the collapse of Native American groups that took place due to infectious diseases [32] and the conquest wars, may explain the high prevalence of Caucasian genetic blocks within Mexican admixed individuals [33]. African contribution, although subtle, is present in admixed Mexicans due to slaves introduced to Mexico from Africa during the first three centuries of Spanish colonial domination. All African specific associations present in this study are found in Sub Saharan Africa [14,18,34,], the place where slaves were extracted from by colonial slave traders [18,35]. For example, C*07:01/B*49:01, C*04:01/B*53:01, C*06:02/B*58:02, DRB1*13:01/DQB1*03:03, and DRB1*08:04/DQB1*03:01 blocks have been found in Africa, for instance in Bandiagara from Mali, Bantu from Congo, Bioko from Equatorial Guinea, Luo and Nandi from Kenya, Lusaka from Zambia, Ugandans and Kampala from Uganda, and Yaounde from Cameroon, [18,36–39] and have been reported also in African American population from the US [40].

On the other hand, the presence of Asian genes in Mexican population possibly resulted from relative recent immigration of Chinese traders and slaves by transpacific travels from the oriental shores of Asia to the western coasts of Mexico, mainly disembarking in the port of Acapulco. Thus, the *Não de China* (the Manila Galleon) route, together with a foreign investment policy starting in the 19th century, helped the Chinese community to become the largest non-Spaniard community in Mexico by mid-1920s [41]. The Asian contribution to the genetic pool conformation of Mexico is modest, mainly due to lack of admixture between Asian immigrants and Mexicans; however, classical Asian associations were found in our sample such as C*04:01/B*35:16 [42] and C*08:01/B*15:02 [18,27,43]. The admixture estimations using different indicators support a tryhybrid model of Amerindian, Caucasian and African ancestry

Table 5. Extension of HLA Conserved Extended Haplotypes to *HLA-A* in 234 Mexican Admixed individuals.

A-C-B-DRB1-DQB1 haplotype					n	H.F.	Δ'	t	
Amerindian	A*24:02	C*07:02	B*39:06	DRB1*14:06	DQB1*03:01	12	0.0256	0.6992	2.76
	A*02:01	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	7	0.0150	0.3518	1.46
	A*68:03	C*07:02	B*39:05	DRB1*04:07	DQB1*03:02	5	0.0107	0.2834	2.02
	A*02:06	C*07:02	B*39:05	DRB1*04:07	DQB1*03:02	5	0.0107	0.1848	1.46
	A*02:01	C*04:01	B*35:12	DRB1*08:02	DQB1*04:02	4	0.0086	0.4444	1.21
	A*02:01	C*01:02	B*15:15	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.1898	0.68
	A*68:01	C*01:02	B*15:15	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.3214	1.38
	A*02:01	C*08:01	B*48:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.1898	0.68
	A*02:06	C*08:01	B*48:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.3085	1.31
	A*24:02	C*04:01	B*35:12	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.1407	0.58
	A*68:01	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.0693	0.64
	A*02:06	C*03:04	B*40:02	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.28
	A*02:06	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.5170	0.47
	A*02:01	C*03:04	B*39:02	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.10
	A*02:01	C*07:02	B*39:05	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.5679	0.93
A*31:01	C*04:01	B*35:17	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.0693	0.64	
Total					59	0.1263			
Caucasian	A*02:01	C*07:02	B*07:02	DRB1*15:01	DQB1*06:02	4	0.0086	0.4444	1.21
	A*30:02	C*05:01	B*18:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	3	0.0064	1.0000	1.72
	A*29:02	C*16:01	B*44:03	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	0.3158	1.32
	A*02:01	C*16:01	B*44:03	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	0.1357	0.45
	A*01:01	C*07:01	B*57:01	DRB1*07:01	DQB1*03:03	2	0.0043	0.6541	1.35
	A*33:01	C*08:02	B*14:02	DRB1*01:02	DQB1*05:01	2	0.0043	0.3922	1.38
Total					15	0.0322			
African	A*66:01	C*06:02	B*58:02	DRB1*13:01	DQB1*03:03	4	0.0086	1.0000	1.99
			Total			4	0.0086		
Unknown	A*02:01	C*07:02	B*39:05	DRB1*04:07	DQB1*03:02	6	0.0128	0.1130	0.68
	A*24:02	C*04:01	B*35:14	DRB1*16:02	DQB1*03:01	4	0.0086	1.0000	1.67
	A*30:01	C*06:02	B*13:02	DRB1*07:01	DQB1*02:02	4	0.0086	1.0000	1.99
	A*68:02	C*04:01	B*53:01	DRB1*13:02	DQB1*06:04	4	0.0086	1.0000	1.96
	A*02:01	C*01:02	B*15:30	DRB1*08:02	DQB1*04:02	3	0.0064	0.6759	1.21
	A*23:01	C*07:01	B*41:01	DRB1*08:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.40
	A*66:01	C*12:03	B*39:10	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	1.0000	1.40
	A*26:01	C*06:02	B*37:01	DRB1*01:03	DQB1*05:01	2	0.0043	1.0000	1.39
	Table 5. Cont.								
	A*26:01	C*06:02	B*45:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	2	0.0043	1.0000	1.39
	A*03:01	C*06:02	B*35:02	DRB1*11:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.38
	A*68:01	C*07:02	B*39:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.31
	A*68:01	C*07:02	B*39:02	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.31
	A*31:01	C*03:03	B*52:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.31
	A*02:06	C*01:02	B*15:30	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.28
A*02:06	C*04:01	B*35:24	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.28	
A*31:01	C*03:05	B*35:01	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.6381	1.25	
A*31:01	C*03:05	B*40:02	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	0.6381	1.25	
A*02:06	C*15:09	B*51:01	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.6312	1.22	
A*31:01	C*03:04	B*40:02	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.4571	1.20	
A*31:01	C*03:05	B*40:02	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.4571	1.20	
A*24:02	C*04:01	B*35:01	DRB1*14:01	DQB1*05:03	2	0.0043	1.0000	1.18	
A*24:02	C*04:01	B*35:12	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.18	

Table 5. Cont.

A-C-B-DRB1-DQB1 haplotype					n	H.F.	Δ'	t
A*24:02	C*01:02	B*35:43	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.18
A*24:02	C*03:04	B*40:02	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.18
A*02:06	C*03:04	B*40:02	DRB1*16:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.4468	1.15
A*02:01	C*07:02	B*07:02	DRB1*11:04	DQB1*03:01	2	0.0043	1.0000	1.10
A*02:01	C*01:02	B*15:01	DRB1*04:04	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.10
A*02:01	C*01:02	B*35:43	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.10
A*02:01	C*03:04	B*39:02	DRB1*04:11	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.10
A*02:01	C*05:01	B*44:02	DRB1*04:02	DQB1*03:02	2	0.0043	1.0000	1.10
A*02:01	C*08:03	B*48:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.10
A*02:01	C*15:09	B*51:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	1.0000	1.10
A*24:02	C*01:02	B*15:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.5990	1.06
A*24:02	C*07:02	B*39:06	DRB1*04:07	DQB1*03:02	2	0.0043	0.3985	0.94
A*02:01	C*03:03	B*52:01	DRB1*14:06	DQB1*03:01	2	0.0043	0.5679	0.93
A*02:01	C*04:01	B*35:01	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.5679	0.93
A*02:01	C*07:02	B*39:05	DRB1*14:02	DQB1*03:01	2	0.0043	0.5679	0.93
A*24:02	C*07:02	B*39:05	DRB1*08:02	DQB1*04:02	2	0.0043	0.2782	0.82
Total					87	0.1869		

Blocks of each ancestry (Amerindian, Caucasian, Caucasian shared with other populations, African and Asian) were defined as those found in original populations with H.F. >1,0%, and not found in other native human groups in frequencies higher than 1,0%. We consider t value must be ≥ 2.0 to denote statistically significant association and thus validate Δ' (shaded values).

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t005

in Mexicans. But we were able to detect also a small Asian component in Mexicans.

It is well known that MHC diversity influences the susceptibility or resistance to a wide variety of autoimmune disorders and infectious diseases caused by viruses, yeasts, bacteria and parasites. It has been suggested that pathogen-mediated selection might explain the maintenance of MHC diversity at population level [44,45]. However, the role of MHC diversity associated to the admixture between different ethnic groups in the resistance or susceptibility to autoimmune or infectious disease remains unclear. Furthermore, recent studies have suggested that genes that confer susceptibility to autoimmune diseases might be maintained in specific ethnic groups because they primarily confer protection against infectious agents, the major factor driving selection and influencing human adaptation to local environments [2–6,46–48]. Functional studies are necessary to define whether the genetic

diversity of HLA is influenced in pathogen-enriched environments. The analyses of HLA diversity in the context of pathogen richness have shown a positive correlation between HLA class I allele diversity and pathogen richness and a negative correlation of HLA class II diversity, particularly *HLA-DQB1* loci, and pathogen richness, suggesting that HLA class I and class II genes have distinct evolutionary strategies to confer immunity against infectious agents [5]. In this context, the higher diversity of HLA class I genes may result from the high mutation rate of intracellular pathogens, particularly viruses. In contrast, the lower diversity of MHC class II genes might result from the fixation of some alleles that provide efficient immune protection against highly prevalent extracellular pathogens in specific populations (e.g. parasites). In Mexicans, we found a high frequency of some MHC class II alleles that predispose to rheumatoid arthritis (RA) (DRB1*04:04, DRB1*14:02, and DRB1*01:02), to systemic lupus erythematosus (SLE) (DRB1*03:01) [11] and to systemic sclerosis (SSc) (DRB1*11:04) (Rodriguez-Reyna TS et al., Unpublished data). It is possible that class II MHC alleles associated with autoimmunity, together with alleles found in Native American populations may have increased their frequencies due to past selective processes or infectious and parasitic diseases developed in different environments and thus explain in part the susceptibility to develop autoimmune diseases in Mexico or the clinical characteristics of these diseases in Mexican population.

In summary, Mexican admixed individuals from the central area of Mexico have an important component of Amerindian and Caucasian MHC class I (*HLA-C/-B*) and class II (*HLA-DRB1/-DQB1*) blocks and HLA CEHs. A relatively low frequency of African and Asian HLA blocks and CEHs were detected. In line with these results, admixture estimations using STRs and *HLA-B* revealed a greater proportion of Amerindian, followed by Caucasian and African ancestry in this population. The high frequency of certain relatively fixed haplotypes might result from

Table 6. Measures of genetic diversity at the allele level for HLA system in a Mexican admixed population.

HLA Allele	O.H.	E.H.	p value	PIC	PD
<i>HLA-A</i>	0.8718	0.8919	0.5303	0.8776	0.7382
<i>HLA-B</i>	0.9487	0.9668	0.2942	0.9544	0.8531
<i>HLA-C</i>	0.9009	0.8947	0.2001	0.8845	0.7972
<i>HLA-DRB1</i>	0.9013	0.9193	0.0061	0.9123	0.7981
<i>HLA-DQB1</i>	0.8205	0.8256	0.2682	0.8020	0.6376

O.H.: Observed heterozygosity. E.H.: Expected Heterozygosity. p values <0.05 are considered statistically significant and thus reflect differences between O.H. and E.H. PIC: Polymorphism Information Contents. PD: Power of Discrimination.

doi:10.1371/journal.pone.0074442.t006

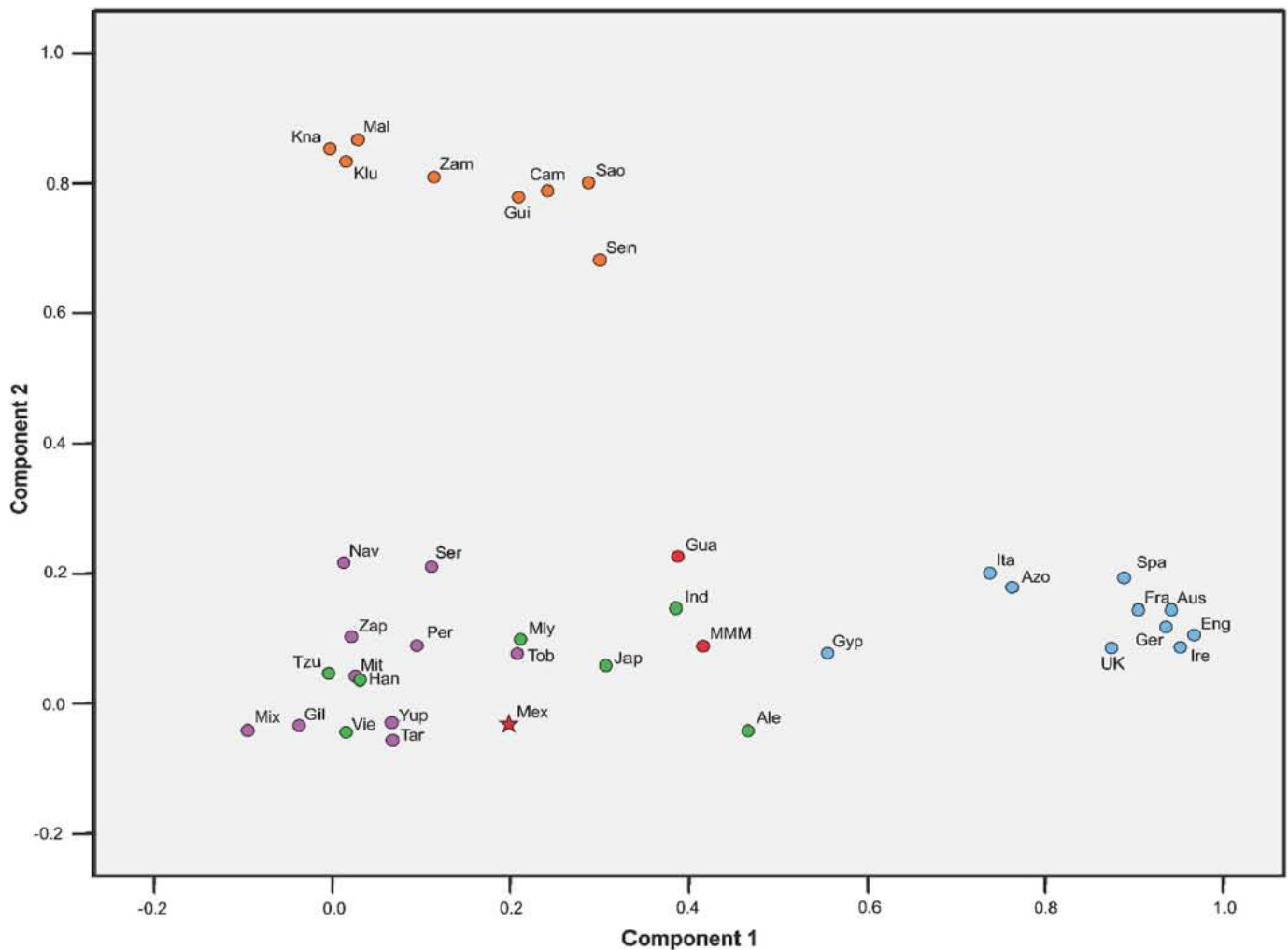


Figure 1. Principal component analysis (PCA) plot reveals a close genetic relationship of Mexican admixed individuals from Mexico City to Native American groups. Orange dots refer to African populations. Blue dots represent European samples. Green dots correspond to Asian human groups. Native American populations are represented by purple dots. Red figures are admixed populations from Mexico, with a star locating our Mexico City admixed sample. Proper references of each population group included in the analysis are given in the Materials and Methods section. Ire: Ireland, Eng: England, Ger: Germany, Aus: Austria; Spa: Spain, Ita: Italy, UK: United Kingdom, Fra: France, Gyp: Gypsy, Azo: Azores, Sao: São Tomé Island, Cam: Cameroon, Mal: Mali, Zam: Zambia, KLu: Luo from Kenya, KNa: Nandi from Kenya, Sen: Senegal, Gui: Guinea Bissau, Ale: Aleut from Bering Island, Jap: Japan, Tzu: Taiwan, Han: south China, Ind: north India, Mly: Malasya, Vie: Vietnam, Tar: Tarahumara, Gil: Native Americans from Gila River, Yup: Yu'pik from Alaska, Mit: Mixtec from Oaxaca, Zap: Zapotec from Oaxaca, Mix: Mixe from Oaxaca, Ser: Seri from Sonora, Nav: Navajo from New Mexico, Uro: Uro from Titikaka Lake, Tob: Toba from Rosario, MMM: "Mexican Mestizo" sample, Gua: Guadalajara City, Mex: this study.

doi:10.1371/journal.pone.0074442.g001

many possible mechanisms, including recent population bottlenecks, recombination suppression, preferential transmission, migration and admixture, and/or genetic drift or natural selection. Our findings suggest that the study of HLA class I and class II blocks and CEHs diversity might be useful to characterize the ancestral contributions in admixed populations, as well as to perform studies of disease susceptibility and transplantation.

Materials and Methods

Subjects

A total of 234 unrelated Mexican admixed individuals were studied, including a group of 80 Mexican admixed participants belonging to 40 families. A total number of 468 haplotypes were analyzed in this study. Every participant came from Mexico City and had a Mexican ancestry whose parents and grandparents were

born in Mexico. Age mean of studied individuals was 38.2 ± 15.3 years. There were 120 females (51%) and 114 males (49%).

Ethics Statement

The Institutional Review Board of the National Institute of Respiratory Diseases (INER) reviewed and approved the protocols for genetic studies. All subjects provided written informed consent for these studies, and they authorized the storage of their DNA samples at INER repositories for this and future studies. In this study we did not collect samples from minors/children, only young adults older than 17 years were included.

HLA Typing

Genomic DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). High-resolution HLA class I and class II typing was performed by a sequence-based method (SBT) as previously

described [49]. Briefly, we amplified exon 2 and 3 from *HLA-A*, *-B* and *-C* and exon 2 for *HLA-DRB1* and *-DQB1*. Polymerase chain reaction (PCR) contained 1.5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH = 8.3), 200 mM concentrations of each dATP, dTTP, dGTP, and dCTP; 10 pM concentration of each primer, 30 ng of DNA and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase in a final volume of 25 μ l. Amplification was done on a PE9700 thermal cycler (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) using the following cycling conditions: 95°C for 30 s, 65°C for 30 s, 72°C for 1 min, preceded by 5 min at 95°C, and followed by a final elongation at 72°C for 5 min. Amplified products were sequenced independently in both directions using *BigDye Terminator*TM chemistry in an ABI PRISM[®] 3730xl Genetic Analyzer (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Data were analyzed using match tools allele assignment software (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) using the IMGT/HLA sequence database alignment tool (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>) [50]. Ambiguities were solved using group-specific sequencing primers (GSSPs) that have been reported and validated previously [49].

HLA Blocks and Conserved Extended Haplotypes Assignment

HLA allelic and haplotypic frequencies were obtained by gene counting; one hundred and sixty of the 468 haplotypes were obtained by direct observation because they were obtained by HLA typing in the parents and siblings of 40 families, while the rest were acquired from HLA genotyping of 154 non-related individuals. Haplotypes were estimated by maximum likelihood methods using the computer program Arlequin ver. 3.0 [51]. This software was also used to calculate HWE, OH, and EH at a locus-by-locus level with 1×10^6 steps in the Markov chain and 1×10^5 dememorization steps. *p*-values ≤ 0.05 indicated statistical difference between OH and EH and thus a deviation from HWE. Listed *HLA-C/B*, *HLA-DRB1/DQB1* and CEHs and their extension to the *HLA-A* locus of Mexican origin were estimated by the maximum likelihood method based on the Δ' between alleles of two loci and between the two blocks and/or the extension to the *HLA-A* region, as previously described [18]. Haplotypes or DNA blocks of African, Asian and Caucasian MPA were assigned based on previous reported frequencies [7,13,18]. Estimation of delta (Δ) and relative delta (Δ') values to measure LD, nonrandom association of alleles at two or more loci, and their statistical significance, were calculated using previously described methods [18]. Absolute Δ' values of 1 indicates complete LD; 0 corresponds to no LD. As many of these associations may return $|\Delta'|$ values of 1.000 -even though that value may be result of a random association between two infrequent alleles- we used the statistic parameter *t*, to validate all Δ' data adjusted by sample size and number of times that each allele appeared in the sample [52]. Only *t* values ≥ 2.0 were considered significant.

HLA Genetic Diversity Calculations

Genetic diversity of each HLA loci was assessed by two previously described forensic parameters: PIC and PD [53–55] that were computed using the PowerStat ver.1.2 spreadsheet (*Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA*) as described elsewhere [56]. PIC measures the strength of a genetic marker for linkage studies by indicating the degree of polymorphism of a locus. PIC > 0.5 is considered as highly polymorphic [54]. PD is defined as the probability of finding two random individuals with different genotypes for that locus in the studied population, and values higher than 0.8 indicate high polymorphism in the studied population context [57]. The OH and EH of all HLA loci was also calculated [53].

Admixture Estimations in Mexicans using HLA Genes

Admixture estimates were obtained by maximum-likelihood method using the *Leadmix* software [58], with *k* = 4 parental populations (Africa, America, Asia, and Europe) and *HLA-B* as the genetic estimator. Caucasian component was estimated with a pooled sample (N = 315) consisting of data from southern Portugal [34] and an European population sample from USA [18]; African Nandi from Kenia [59] served as the African parental component (N = 239); a pooled Native American sample (N = 146) was used, which consisted of data from Mixtec of Oaxaca, SE Mexico [16] and Tarahumara from Chihuahua, north of Mexico [17]; finally, Han from southern China data (N = 281) were used to estimate the Asian contribution [60]. Principal Components Analysis (PCA) for 38 populations with HLA-B data available was performed using the IBM SPSS Statistics 19 software (*IBM Corporation, Armonk, NY, USA*) to analyse the distribution of HLA-B alleles in human groups of the proposed ancestries, **Figure 1**. PCA included population data of Ireland [20], NW of England [61], Germany [62], Austria [63]; Spain, Italy, United Kingdom [64], France [65], Gypsy from Andalucía (Spain; data collected by López-Nevot *et al.*) [14], Azores Terceira Island [66], Forro from São Tomé Island [67], Beti from Cameroon [68], Bandiagara from Mali, Lusaka from Zambia, Luo and Nandi from Kenia [69], Mandeka from Senegal [70], Guinea Bissau [71], Aleut from Bering Island (Russia) [72], center of Japan [73], a cord blood bank of Tzu Chi Foundation (Taiwan) [74], Han from southern China [60], north India [75], Kensi from Malaysia [76], Kinh from Vietnam [77], Tarahumara from northern Mexico [17], Native Americans from Gila River (USA) [78], Yu'pik from Alaska (USA) [79], Mixtec, Zapotec, and Mixe from Oaxaca (Mexico) [16], Seri from Sonora (Mexico) [80], Navajo from New Mexico (USA) [81], Uro from Titikaka Lake (Peru) [82], and Toba from Rosario (Argentina; data collected by Cintia Marcos *et al.*) [14]. Also, two admixed populations from Mexico were included: a "Mexican Mestizo" sample [83] and a sample from Guadalajara City, western Mexico [23]. As an approach to estimate the diversity and contribution of previously described [7,13] Caucasian, Asian, and African HLA blocks in our population, we also calculated the aggregate block frequencies (ABF) [7,13] adding the frequencies of those HLA class I and II blocks with frequencies greater than 1% in our study population.

Admixture Estimations in Mexicans using STRs

We genotyped fifteen autosomal STR markers (*CSF1PO*, *FGA*, *TH01*, *TPOX*, *VWA*, *D3S1358*, *D5S818*, *D7S820*, *D8S1179*, *D13S317*, *D16S539*, *D18S51*, *D21S11*, *D19S433*, and *D2S1338*) along with amelogenin using the Applied Biosystems AmpF_{STR} Identifier Kit (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). PCR amplification was carried out on a Gene Amp 7500 thermocycler (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) using 1 ng of DNA according to the manufacturer's protocol. The PCR conditions were: 95°C during 11 min followed by 28 cycles of 94°C for 1 min, 59°C for 1 min, 72°C for 1 min followed by a hold at 60°C for 60 min. PCR products were diluted 1:15 in *Hi-Di*TM formamide and GS500-LIZ internal size standard (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) and analyzed on the ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Allele calls were made using Genotype 3.7 software by comparison with kit allelic ladders (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). We performed an admixture estimation using the STR's data by a model-based clustering method with the *Structure* software v. 2.3.4 [84], assuming *k* = 3 populations and 1×10^4 dememorisation steps, using Spaniards [85], Fang Africans [86], and a Native-American pool of Huastecos [87] and Tepehuas [88] from the central region of Mexico, as parental populations.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JZ EJY NY RB JG MFV GVA TSRR. Performed the experiments: NY TL SA MO ACL. Analyzed the

data: JZ EJY NY JG JGM MFV RB VAA. Contributed reagents/materials/analysis tools: JZ NY SA MO MY RB VAA TL. Wrote the paper: JZ TSRR EJY JG RB VAA.

References

- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, et al. (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 12: 889–899.
- de Vries RR, Meera Khan P, Bernini LF, van Loghem E, van Rood JJ (1979) Genetic control of survival in epidemics. *J Immunogenet* 6: 271–287.
- Gilbert SC, Plebanski M, Gupta S, Morris J, Cox M, et al. (1998) Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *Science* 279: 1173–1177.
- Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guegan JF, Guernier V, et al. (2005) Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Current Biology* 15: 1022–1027.
- Sanchez-Mazas A, Lemaître JF, Currat M (2012) Distinct evolutionary strategies of human leucocyte antigen loci in pathogen-rich environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 830–839.
- Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK (2002) MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11260–11264.
- Yunis EJ, Zúñiga J, Larsen CE, Fernandez-Vina M, Granados J, et al. (2005) Single Nucleotide Polymorphism blocks and haplotypes: Human MHC block diversity. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 191–215.
- Lisker R, Ramírez E, Briceño RP, Granados J, Babinsky V (1990) Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 62: 791–801.
- Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, Acuña-Alonso V, Montoya-Gama K, et al. (2008) HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol* 45: 1171–1178.
- Juárez-Cedillo T, Zúñiga J, Acuña-Alonso V, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, et al. (2008) Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int Genet* 2: e37–e39.
- Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F, Melin-Aldana H, Alcocer-Varela J, et al. (1996) The role of HLA-DR alleles and complex types through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. *Lupus* 5: 184–189.
- Cepellini R, Curtoni ES, Mattiuz PL, Miggiano V, Scudeller G, et al. (1967) Genetics of leukocyte antigens: A family study of segregation and linkage. In: Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi RM, editors. *Histocompatibility*. Copenhagen: Munksgaard. 189–202.
- Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Viña M, Awdeh ZL, Romero T, et al. (2003) Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. *Tissue Antigens* 62: 1–20.
- González-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR (2011) Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acid Res* 39: D913–D919.
- Chu CC, Trejaut J, Lee HL, Chang SL, Lin M (2007) Ivatan from Bantanes, Philippines. *Anthropology/human genetic diversity population reports*. In: Hansen JA (ed) *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference, Volume I*. Seattle: IHWG Press. 611–615.
- Hollenbach JA, Thomson G, Cao K, Fernández-Viña M, Erlich HA, et al. (2001) HLA diversity, differentiation, and haplotype evolution in Mesoamerican Natives. *Hum Immunol* 62: 378–390.
- García-Ortiz JE, Sandoval-Ramírez L, Rangel-Villalobos H, Maldonado-Torres H, Cox S, et al. (2006) High-resolution molecular characterization of the HLA class I and class II in the Tarahumara Amerindian population. *Tissue Antigens* 68: 135–146.
- Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, et al. (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.
- Layrisse Z, Guedez Y, Domínguez E, Paz N, Montagnani S, et al. (2001) Extended HLA haplotypes in a Carib Amerindian population: the Yuupa of the Perija Range. *Hum Immunol* 62: 992–1000.
- Dunne C, Crowley J, Hagan R, Rooney G, Lawlor E (2008) HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 and DPB1 alleles and haplotypes in the genetically homogenous Irish population. *Int J Immunogenet* 35: 295–302.
- Middleton D, Williams F, Hamill MA, Meenagh A (2000) Frequency of HLA-B alleles in a Caucasoid population determined by a two-stage PCR-SSOP typing strategy. *Hum Immunol* 61: 1285–1297.
- Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, et al. (2009) Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol* 70: 895–902.
- Leal CA, Mendoza-Carrera F, Rivas F, Rodríguez-Reynoso S, Portilla-de Buen E (2005) HLA-A and HLA-B allele frequencies in a mestizo population from Guadalajara, Mexico, determined by sequence-based typing. *Tissue Antigens* 66: 666–673.
- Martínez-Cortés G, Salazar-Flores J, Haro-Guerrero J, Rubi-Castellanos R, Velarde-Félix JS, et al. (2013) Maternal admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on mtDNA haplogroups. *Am J Phys Anthropol* 151: 526–537.
- Cerna M, Falco M, Friedman H, Raimondi E, Maccango A, et al. (1993) Differences in HLA class II alleles of isolated South American Indian populations from Brazil and Argentina. *Hum Immunol* 37: 213–220.
- Fernández-Viña MA, Lázaro AM, Marcos CY, Nulf C, Raimondi E, et al. (1997) Dissimilar evolution of B-locus versus A-locus and class II of the HLA region in South American Indian tribes. *Tissue Antigens* 50: 233–250.
- Monsalve MV, Edin G, Devine DV (1998) Analysis of HLA class I and class II in Na-Dene and Amerindian populations from British Columbia, Canada. *Hum Immunol* 59: 48–55.
- Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, Martín-Villa M, et al. (2003) Origin of Mayans according to HLA genes and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 61: 425–436.
- Erlich HA, Mack SJ, Bergström T, Gyllensten UB (1997) HLA class II alleles in Amerindian populations: implications for the evolution of HLA polymorphism and the colonization of the Americas. *Hereditas* 127: 19–24.
- Tsumeto LT, Probst CM, Hutz MH, Salzano FM, Rodríguez-Delfin LA, et al. (2003) HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. *Tissue Antigens* 62: 512–526.
- Sanchez-Mazas A, Fernández-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, et al. (2011) Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology* 133: 143–164.
- Marr JS, Kiracofe JB (2000) Was the Huey Cocoliztli a haemorrhagic fever? *Med Hist* 44: 341–362.
- Arrieta-Bolaños E, Madrigal JA, Shaw BE (2012) Human Leukocyte Antigen profiles of Latin American populations: differential admixture and its potential impact on hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Res* 2012: 136087.
- 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. *Ann Hum Genet* 66: 285–296.
- Barquera R, Acuña-Alonso V (2012) The African colonial migration into Mexico: History and biological consequences. In: Crawford MH & BC Campbell (ed). *Causes and Consequences of Human Migration. An evolutionary perspective*. Cambridge University Press. pp. 201–223.
- de Pablo R, García-Pacheco JM, Vilches C, Moreno ME, Sanz L, et al. (1997) HLA class I and class II allele distribution in the Bubi population from the island of Bioko (Equatorial Guinea). *Tissue Antigens* 50: 593–601.
- Ellis JM, Mack SJ, Leke RF, Quakyi I, Johnson AH, et al. (2000) Diversity is demonstrated in class I HLA-A and HLA-B alleles in Cameroon, Africa: description of HLA-A*03012, *2612, *3006 and HLA-B*1403, *4016, *4703. *Tissue Antigens* 56: 291–302.
- Renquin J, Sánchez-Mazas A, Halle L, Rivalland S, Jaeger G, et al. (2001) HLA class II polymorphism in Aka Pygmies and Bantu Congolese and a reassessment of HLA-DRB1 African diversity. *Tissue Antigens* 58: 211–222.
- Kijak GH, Walsh AM, Koehler RN, Moqueet N, Eller LA, et al. (2009) HLA class I allele and haplotype diversity in Ugandans supports the presence of major east African genetic cluster. *Tissue Antigens* 73: 262–269.
- Maier M, Gragert L, Klitz W (2007) High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Hum Immunol* 68: 779–788.
- Hu-Dehart E (1995) The Chinese of Peru, Cuba, and Mexico. In: Cohen R (ed). *The Cambridge survey of world migration*. Cambridge. Cambridge University Press. 220–391.
- Shankarkumar U (2004) HLA-A, -B, and -Cw allele frequencies in a Parsi population from Western India. *Hum Immunol* 65: 992–993.
- Shi L, Shi L, Yao YF, Matsushita M, Yu L, et al. (2010) Genetic link among Hani, Bulang, and other Southeast Asian populations: evidence from HLA -A, -B, -C, -DRB1 genes and haplotypes distribution. *Int J Immunogenet* 37: 467–475.
- Doherty P, Zinkernagel R (1975) A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* 1: 1406–1409.
- Jeffery KJ, Bangham CR (2000) Do infectious diseases drive MHC diversity? *Microbes Infect* 2: 1335–1341.
- Fumagalli M, Sironi M, Pozzoli U, Ferrer-Admetta A, Pattini L, et al. (2011) Signatures of environmental genetic adaptation pinpoint pathogens as the main selective pressure through human evolution. *PLoS Genet* 7: e1002355.
- Finch CE, Crimmins EM (2004) Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science* 305: 1736–1739.
- Gluckman PD, Hanson MA (2004) Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305: 1733–1736.

49. Lebedeva TV, Mastromarino SA, Lee E, Ohashi M, Alosco SM, et al. (2011) Resolution of HLA class I sequence-based typing ambiguities by group-specific sequencing primers. *Tissue Antigens* 77: 247–250.
50. Robinson J, Waller MJ, Parham P, Bodmer JG, Marsh SG (2001) I MGT/HLA Database—a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Nucleic Acid Res* 29: 210–213.
51. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47–50.
52. Haseman JK, Elston RC (1972) The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav. Genet.* 2:3–19.
53. Yasuda N (1988) HLA polymorphism information content (PIC). *Jinrui Idengaku Zasshi* 33: 385–387.
54. Shen CM, Zhu BF, Deng YJ, Ye SH, Yan JW, et al. (2010) Allele polymorphism and haplotype diversity of HLA-A, -B and -DRB1 loci in sequence based typing for Chinese Uyghur ethnic group. *PLoS ONE* 5: e13458.
55. Yan C, Wang R, Li J, Deng Y, Wu D, et al. (2003) HLA-A gene polymorphism defined by high-resolution sequence-based typing in 161 Northern Chinese Han people. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 1: 304–309.
56. Tereba A (1999) Tools for analysis of population statistics. *Profiles DNA* 2: 3–5.
57. Zhu BF, Yang G, Shen CM, Qin HX, Liu SZ, et al. (2010) Distributions of HLA-A and -B alleles and haplotypes in the Yi ethnic minority of Yunnan, China: relationship to other populations. *J Zhejiang Univ Sci B* 11: 127–135.
58. Wang J (2003) Maximum Likelihood estimation of admixture proportions from genetic data. *Genetics* 164: 747–765.
59. Cao K, Moormann AM, Lyke KE, Masaberg C, Sumba OP, et al. (2004) Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci. *Tissue Antigens* 63: 293–325.
60. Trachtenberg E, Vinson M, Hayes E, Hsu YM, Houtchens K, et al. (2007) Southern Han Chinese from People's Republic of China. *Anthropology/human genetic diversity population reports*. In: Hansen JA (ed.). *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference*. Seattle: IHWG Press. pp. 616–617.
61. Alfirevic A, Gonzalez-Galarza F, Bell C, Martinsson K, Platt V, et al. (2012) In silico analysis of HLA associations with drug-induced liver injury: use of a HLA-genotyped DNA archive from healthy volunteers. *Genome Med* 6: 51.
62. Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, et al. (2009) Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol* 11: 895–902.
63. Rosenmayr A, Pointner-Prager M, Winkler M, Mitterschiffthaler A, Pelzmann B, et al. (2011) The Austrian Bone Marrow Donor Registry: Providing Patients in Austria with Unrelated Donors for Transplant - a Worldwide Cooperation. *Transfus Med Hemother* 5: 292–299.
64. Pingel J, Solloch UV, Hofmann JA, Lange V, Ehninger G, et al. (2013) High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: how can they be used to improve unrelated donor searches? *Hum Immunol* 74: 330–340.
65. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, et al. (2007) HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 965–974.
66. Spinola H, Brehm A, Bettencourt B, Middleton D, Bruges-Armas J (2005) HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands. *Tissue Antigens* 66: 217–30.
67. Saldanha N, Spinola C, Santos MR, Simões JP, Bruges-Armas J, et al. (2009) HLA polymorphisms in Forros and Angolares from São Tomé Island (West Africa): Evidence for the Population Origin. *Journal of Genetic Genealogy* 5: 76–85.
68. Torimiro JN, Carr JK, Wolfe ND, Karacki P, Martin MP, et al. (2006) HLA class I diversity among rural rainforest inhabitants in Cameroon: identification of A*2612-B*4407 haplotype. *Tissue Antigens* 67: 30–37.
69. Cao K, Moormann AM, Lyke KE, Masaberg C, Sumba OP, et al. (2004) Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci. *Tissue Antigens* 63: 293–325.
70. Sanchez-Mazas A, Steiner QG, Grundschober C, Tiercy JM (2000) The molecular determination of HLA-Cw alleles in the Mandenka (West Africa) reveals a close genetic relationship between Africans and Europeans. *Tissue Antigens* 56: 303–312.
71. Spinola H, Bruges-Armas J, Middleton D, Brehm A (2005) HLA polymorphisms in Cabo Verde and Guiné-Bissau inferred from sequence-based typing. *Hum Immunol* 66: 1082–1092.
72. Moscoso J, Crawford MH, Vicario JL, Zlojutro M, Serrano-Vela JI, et al. (2008) HLA genes of Aleutian Islanders living between Alaska (USA) and Kamchatka (Russia) suggest a possible southern Siberia origin. *Mol Immunol* 45: 1018–1026.
73. Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M (2000) Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. *Tissue Antigens* 56: 522–529.
74. Wen SH, Lai MJ, Yang KL (2008) Human leukocyte antigen-A, -B, and -DRB1 haplotypes of cord blood units in the Tzu Chi Taiwan Cord Blood Bank. *Hum Immunol* 69: 430–436.
75. Rani R, Marcos C, Lazaro AM, Zhang Y, Stastny P (2007) Molecular diversity of HLA-A, -B and -C alleles in a North Indian population as determined by PCR-SSOP. *Int J Immunogenet* 34: 201–208.
76. Jinam TA, Saitou N, Edo J, Mahmood A, Phipps ME (2010) Molecular analysis of HLA Class I and Class II genes in four indigenous Malaysian populations. *Tissue Antigens* 75: 151–158.
77. Hoa BK, Hang NT, Kashiwase K, Ohashi J, Lien LT, et al. (2008) HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam. *Tissue Antigens* 71: 127–134.
78. Williams R, Chen YF, Endres R, Middleton D, Trucco M, et al. (2009) Molecular variation at the HLA-A, B, C, DRB1, DQA1, and DQB1 loci in full heritage American Indians in Arizona: private haplotypes and their evolution. *Tissue Antigens* 74: 520–533.
79. Leffell MS, Fallin MD, Erlich HA, Fernandez-Viña M, Hildebrand WH, et al. (2002) HLA antigens, alleles and haplotypes among the Yup'ik Alaska natives: report of the ASHI Minority Workshops, Part II. *Hum Immunol* 63: 614–625.
80. Infante E, Alaez C, Flores H, Gorodezky C (2007) Seri from Sonora, Mexico. In *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference*, ed by Hansen JA, Seattle: IHWG Press, pp633–634.
81. Mack SJ, Crawford MH, Saha N, Jani AJ, Geyer LN, et al. (2007) North Indians from New Delhi, India. Vol. I. In *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference*, ed by Hansen JA, Seattle: IHWG Press, pp605–607.
82. Arnaiz-Villena A, Gonzalez-Alcos V, Serrano-Vela JI, Reguera R, Barbolla L, et al. (2009) HLA genes in Uros from Titikaka Lake, Peru: origin and relationship with other Amerindians and worldwide populations. *Int J Immunogenet* 36: 159–167.
83. Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, et al. (2000) Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 61: 1048–1052.
84. Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
85. Sanz P, Prieto V, Flores I, Torres Y, López-Soto M, et al. (2001) Population data of 13 STRs in Southern Spain (Andalusia). *Forensic Sci Int* 119: 113–115.
86. Calzada P, Suárez I, García S, Barrot C, Sánchez C, et al. (2005) The Fang population of Equatorial Guinea characterized by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med* 119: 107–110.
87. Barrot C, Sánchez C, Ortega M, González-Martín A, Brand-Casadevall C, et al. (2005) Characterisation of three Amerindian populations from Hidalgo State (Mexico) by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med* 119: 111–115.
88. González-Martín A, Gorostiza A, Rangel-Villalobos H, Acumha V, Barrot C, et al. (2008) Analyzing the genetic structure of the Tepichua in relation to other neighbouring Mesoamerican populations. A study based on allele frequencies of STR markers. *Am J Hum Biol* 20: 605–613.