



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

ASOCIACIONES KIR-HLA EN PACIENTES VIH POSITIVOS
MEXICANOS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
DANIELA GARRIDO RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. GUSTAVO REYES TERÁN
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis hijos, Covadonga y Caetano, por ser mi ancla, mi luz y mis fuerzas para salir adelante; por enseñarme a no rendirme y siempre tener esa alegría que ilumina hasta el día más oscuro. Los amo.

A Efren, por tu apoyo en cada momento y por siempre tener las palabras exactas para cada momento, gracias por tantos años de amor y alegrías.

A mis padres, por siempre confiar en mí y enseñarme a no bajar la cabeza. Gracias por enseñarme a luchar por los sueños sin importar lo difícil que parezca alcanzarlos.

Sin ustedes no habría llegado a ser la persona que hoy soy.

A Gaby, por siempre estar junto a mí dándome consejos y apoyándome en todas mis aventuras. Este logro es uno más de nuestra larga lista, gracias por todo tu apoyo y sobre todo por ser la mejor hermana y persona que entiende esta vida de locura

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Gustavo Reyes Terán, director del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y mi tutor, por su apoyo, confianza e interés en mi formación y por abrirme las puertas de su grupo de investigación.

Agradezco a Humberto Valenzuela, Selma Alva, Olivia Briceño, Thalia García, Claudia García, Daniela Tapia, Maribel Soto, Sandra Pinto y Celia Boukadida del CIENI del INER, por su constante apoyo y amistad. Sin ustedes este trabajo no habría sido posible.

Agradezco a Christopher E. Ormsby y Helena Reyes, del CIENI del INER, por su apoyo y esfuerzo en el análisis de datos.

Agradezco a Ramón Hernández, Carolina Demeneghi, Mario Preciado, Raymundo González, Israel Molina y Edna Rodríguez, del Laboratorio de Diagnóstico Viroológico del CIENI del INER, por su contribución al presente estudio mediante la realización de pruebas de carga viral y conteo de linfocitos T CD4 positivos.

Agradezco a los médicos del CIENI del INER; Akio Murakami, María Gómez-Palacio, Karla Romero por su enorme ayuda en el reclutamiento de pacientes para el presente estudio.

Agradezco a los médicos de los diferentes estados de la República Mexicana, por contribuir en el reclutamiento de pacientes para integrar la cohorte de estudio del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Juan Carlos Fernandez Lopez, del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por su enorme apoyo en el análisis de datos ancestrales del presente estudio.

Agradezco a Zeidy Arenas, del CIENI del INER, por su enorme labor administrativa y su constante apoyo hacia mi persona y hacia el presente proyecto.

Agradezco a Sandra Zamora, Eduardo López, Berenice Cancino, Guadalupe Hernández, del CIENI del INER, por su apoyo administrativo y organizacional, fundamental para la realización del presente estudio.

Agradezco al Dr. Enrique Ortega y al Dr. Edgar Zenteno por su asesoría académica, paciencia y consejos como parte de mi comité tutorial.

Agradezco a mi familia que a pesar de la distancia siempre han estado presentes en mi vida y me han brindado todo su apoyo y amor. No importa si están en la Patagonia o en el Caribe, su presencia siempre me ha acompañado haciendo que la separación física no es impedimento para los consejos, buenos deseos y apoyo.

Agradezco a mi familia mexicana, tío Juan Carlos, tía Maru, Vicky, tío Toño, Tía Licha, Tío Jorge, porque a pesar de no ser mi familia de sangre han compartido conmigo y con mi familia todos los momentos importantes de mi vida, porque han estado junto a mi dándome su apoyo y amor incondicional haciendo de esta familia adoptiva la mejor que uno puede tener.

Agradezco también a mis primos Tania, Marce, Rene, Pepe, Ana Lilia, Carlos, Brenda y Luis Eduardo, por haber compartido conmigo tantas experiencias y aventuras, por brindarme su apoyo y amor. Sin ustedes no sería la persona que ahora soy. Gracias primos por tanto.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por su apoyo para la realización de este proyecto.

Agradezco al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, sede de realización del presente proyecto

Agradezco al CONACyT por su apoyo económico (becaria No. 23479)

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VIII |
| ÍNDICE DE TABLAS | VIII |
| ANEXOS | VIII |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 1 |
| 1. PANORAMA GLOBAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIH..... | 2 |
| 1.1 Panorama de la Infección por VIH en América Latina y México | 5 |
| 2. COMPONENTE GENÉTICO DE LA POBLACIÓN MEXICANA | 7 |
| 3. ASPECTOS GENERALES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO | 9 |
| 3.1 Inmunidad Innata y Adaptativa | 9 |
| 3.2 Células NK..... | 11 |
| 3.2.1 Subpoblaciones | 11 |
| 3.2.2 Función | 13 |
| | 17 |
| | 17 |
| 3.2.3 Receptores de las células NK..... | 18 |
| | 18 |
| 3.2.3.1 Receptores de Muerte parecidos a Inmunoglobulinas (KIR, Killer immunoglobulin-like receptors)..... | 19 |
| 3.3 Las células NK en la enfermedad: el papel del HLA y KIR..... | 27 |
| 4. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) | 29 |
| 4.1 Historia Natural de la Infección por VIH..... | 32 |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 34 |
| 6. OBJETIVOS..... | 35 |
| 6.1 Objetivo General | 35 |
| 6.2 Objetivos Particulares | 36 |
| 7. HIPÓTESIS..... | 36 |
| 8. MÉTODOS | 37 |
| 8.1 Declaración Ética..... | 37 |
| 8.2 Individuos..... | 37 |
| 8.3 Extracción de ADN; determinación de la presencia o ausencia de los genes KIR y genotipificación de los genes HLA de clase I | 37 |
| 8.4 Determinación del setpoint viral del VIH y conteo de linfocitos T CD4 ⁺ | 38 |
| 8.5 Designación de haplotipos y genotipos KIR..... | 38 |
| 8.6 Tipificación componentes ancestrales | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 8.7 <i>Análisis de componentes ancestrales</i> | 39 |
| 8.8 <i>Análisis estadístico</i> | 40 |
| 8.8.1 Comparación de frecuencias KIR y HLA..... | 40 |
| 8.8.2 Evaluación de la presencia de estructura de base de la población de estudio | 40 |
| 8.8.3 Estrategia de reducción de variables | 41 |
| 8.8.4 Análisis multivariado..... | 41 |
| 9. RESULTADOS | 42 |
| 9.1 <i>Descripción de la Cohorte</i> | 42 |
| 9.2 <i>Perfil genético KIR</i> | 46 |
| 9.2.1 Frecuencia genética KIR | 46 |
| 9.2.2 Perfiles genotípicos y haplotípicos KIR | 48 |
| 9.3 <i>Perfil Genético HLA</i> | 50 |
| 9.3.1 Distribución de alelos HLA y motivos serológicos | 50 |
| 9.4 <i>Efecto del perfil genético KIR y HLA sobre la progresión a la infección por VIH</i> | 52 |
| 10. DISCUSIÓN | 57 |
| 11. CONCLUSIÓN | 60 |
| 12. REFERENCIAS | 60 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Número total de personas viviendo con VIH a nivel mundial de 2001 a 2013..... | 2 |
| Figura 2. Prevalencia de infección por VIH en diferentes regiones del mundo en 2011. | 3 |
| Figura 3. Prevalencia de mujeres (>15 años) viviendo con VIH por región geográfica, 1900-2010 | 4 |
| Figura 4. Prevalencia de infecciones por VIH en México..... | 6 |
| Figura 5. Razón Hombre/Mujer de casos seropositivos a VIH y de casos de SIDA (1983-2012)..... | 7 |
| Figura 6. Componente ancestral de la población mexicana..... | 8 |
| Figura 7. Células Sistema Inmune. | 10 |
| Figura 8. Subpoblaciones de células NK..... | 12 |
| Figura 9. Funciones de las células NK | 14 |
| Figura 10. Regulación de la respuesta inmune..... | 14 |
| Figura 11. Receptores inhibidores anclados a ITIM..... | 15 |
| Figura 12. Receptores activadores anclados a motivos ITAM..... | 17 |
| Figura 13. Receptores de células NK..... | 18 |
| Figura 14.Región de receptores leucocitarios (LRC)..... | 19 |
| Figura 15. Estructura de los dominios de las moléculas KIR..... | 21 |
| Figura 16. Estructura exón-intrón de los genes KIR y su relación con los dominios de la proteína | 22 |
| Figura 17. Clasificación de los genes KIR | 23 |
| Figura 18. Haplotipos KIR | 25 |
| Figura 19. Genes KIR con su respectivo ligando | 27 |
| Figura 20. Diversidad del VIH..... | 30 |
| Figura 21. Diversidad genética del VIH..... | 31 |
| Figura 22. Historia Natural de la infección por VIH..... | 32 |
| Figura 23. Distribución geográfica de la cohorte | 43 |
| Figura 26. Proporción de componentes ancestrales..... | 45 |
| Figura 27 Diversidad genética KIR en la cohorte de estudio | 49 |
| Figura 28. Análisis de Correspondencias Múltiples (MCA). | 53 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 2. Nombres de los Receptores de Muerte parecidos a Inmunoglobulinas (KIR) | 20 |
| Tabla 3. Datos clínicos y demográficos de la cohorte en estudio | 43 |
| Tabla 4. Análisis F_{st} | 45 |
| Tabla 5. Promedio de proporciones ancestrales..... | 46 |
| Tabla 6. Frecuencia de genes KIR en individuos infectados por el VIH..... | 47 |
| Tabla 7 Genotipos, Haplotipos y sub-grupos Bx en la cohorte de estudio por región geográfica y proporciones ancestrales | 50 |
| Tabla 8. Frecuencias HLA en los individuos de la población de estudio | 51 |
| Tabla 9. Motivos serológicos en la cohorte de estudio..... | 52 |
| Tabla 10. Factores genéticos involucrados en la progresión a la enfermedad | 54 |

Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Marcadores informativos de Ancestría (AIMs)..... | 75 |
| Anexo 2. Alelos HLA en la población de estudio | 78 |

Resumen

Los Receptores de Muerte parecidos a Inmunoglobulinas (KIR, por sus siglas en inglés) representan a los genes responsables de la función de las células citolíticas naturales (NK, por sus siglas en inglés), mientras que las moléculas de los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA, por sus siglas en inglés) de clase I definen y restringen la respuesta citotóxica de los linfocitos T. Genes específicos KIR, alelos HLA o combinaciones KIR-HLA se han asociado a la progresión a la enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El gran polimorfismo de los genes KIR y HLA hace necesario el estudio descriptivo de frecuencias en diferentes poblaciones, así como su impacto en la progresión a la enfermedad en contextos inmunogenéticos diferentes. En este estudio reportamos los perfiles genéticos de KIR y HLA de 511 individuos mestizos mexicanos no relacionados infectados por el VIH-1 de 18 estados de la República para los que contamos con sus proporciones ancestrales. Los perfiles genéticos KIR y HLA se compararon entre individuos provenientes de los estados del Norte y Centro-Sur, así como entre individuos con mayor componente ancestral Amerindio (AMI) o Europeo (EUR). Un total de 65 genotipos KIR fueron observados en el estudio, 11 de los cuales presentan nuevas combinaciones de genes KIR. Se observaron un total de 164 alelos HLA; siendo 43 HLA-A, 87 HLA-B y 34 HLA-C. Se observaron diferencias en la distribución de 12 alelos HLA entre individuos con mayor contenido ancestral AMI o EUR ($p < 0.05$, $q < 0.2$). Después de corregir por ancestría genética, los alelos HLA mantuvieron asociación con la progresión a la enfermedad por el VIH, incluyendo nuevas asociaciones con el alelo A*02:06, asociado a conteos bajos de Linfocitos T CD4⁺. No se encontraron asociaciones con genes KIR. Nuestros resultados ponen de manifiesto las ventajas de considerar una estratificación genética detallada dentro de los estudios genéticos para determinar factores genéticos asociados a enfermedades.

Abstract

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) represent the most polymorphic genes responsible for Natural Killer cell function, while human leukocyte antigen (HLA) class I molecules define and restrict cytotoxic T lymphocyte responses. Specific KIR, HLA or KIR-HLA combinations have been implicated in the outcome of human immunodeficiency virus (HIV) disease. The remarkable polymorphism of KIR and HLA genes warrants descriptive gene frequency studies in different populations, as well as their impact on HIV disease progression in different immunogenetic contexts. We report KIR and HLA class I gene profiles of 511 unrelated HIV-infected Mexican Mestizo individuals from 18 states for which genetic ancestry

proportions were assessed. KIR and HLA gene profiles were compared between individuals from the North and Central-South regions of the country and between individuals with higher European (EUR) or Amerindian (AMI) genetic ancestry component. A total of 65 KIR genotypes were observed, 11 harboring novel KIR gene combinations. A total of 164 HLA alleles were observed; 43 HLA-A, 87 HLA-B, and 34 HLA-C. Differences in the distribution of 12 HLA alleles were observed between individuals with higher AMI or EUR ancestry components ($p < 0.05$, $q < 0.2$). After correcting for genetic ancestry, only individual HLA alleles were associated with HIV disease progression, including a novel association with A*02:06, an Amerindian HLA allele associated with lower CD4+ T cell counts. No KIR effects were significant. Our results highlight the advantages of considering a detailed genetic stratification within populations when studying genetic profiles that could be implicated in disease-association studies.

1. Panorama Global de la infección por el VIH

En el año de 1983, se describió por primera vez al agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), el virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). A más de 30 años de su descubrimiento, la infección por VIH continúa siendo un reto para la salud pública mundial, afectando a más de 36 millones de personas en la actualidad (Figura 1)(UNAIDS) con una prevalencia mundial menor al 1% entre adultos de 15 a 49 años .

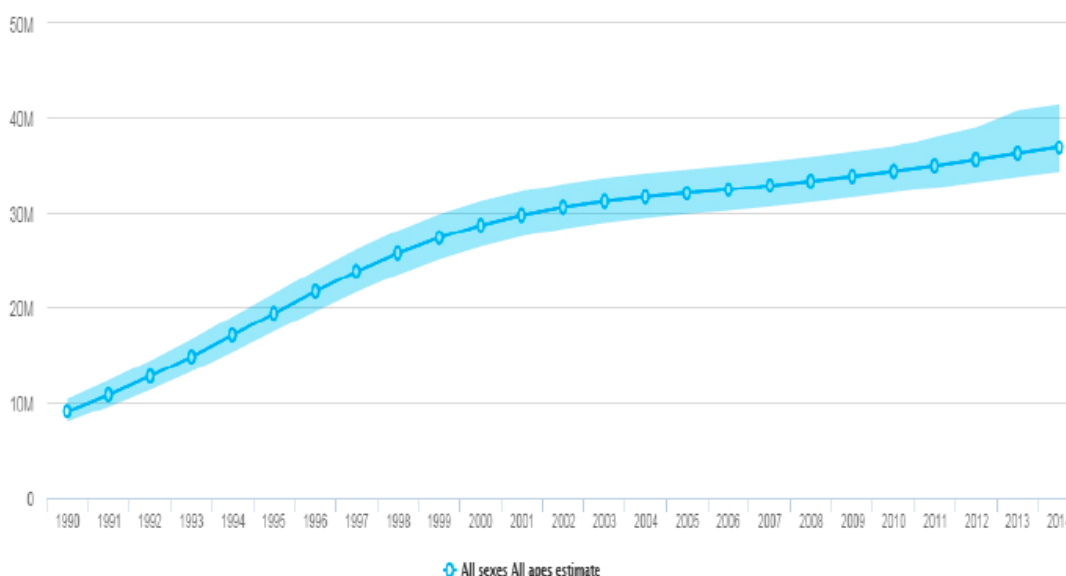


Figura 1. Número total de personas viviendo con VIH a nivel mundial de 2001 a 2013.

Se muestran los datos de todas las personas (adultos y niños) viviendo con VIH a nivel global desde 1990 hasta el 2014. La línea continua representa el estimado global con los datos obtenidos por regiones y países. La zona sombreada azul representa los estimados altos y bajos. Tomado y modificado de (UNAIDS)

El número de personas viviendo con VIH continúa en aumento debido en gran parte al acceso global a antirretrovirales, lo que resulta en una menor mortalidad y una mejor calidad de vida. Sin embargo, la prevalencia mundial de la infección sigue siendo menor al 1% entre adultos de 15 a 49 años, aunque varía considerablemente entre regiones y países (Figura 2)(UNAIDS). Las nuevas infecciones por el VIH han descendido en un 35% (en un 58% entre los niños) desde el año 2000. A escala mundial, 2 millones de personas se infectaron con el VIH en 2014, un descenso respecto a los 3.1 millones de 2010 (AVERT ; UNAIDS). A pesar de esto el número de nuevas infecciones por el VIH y de las muertes relacionadas con el SIDA cada año sigue siendo alto.

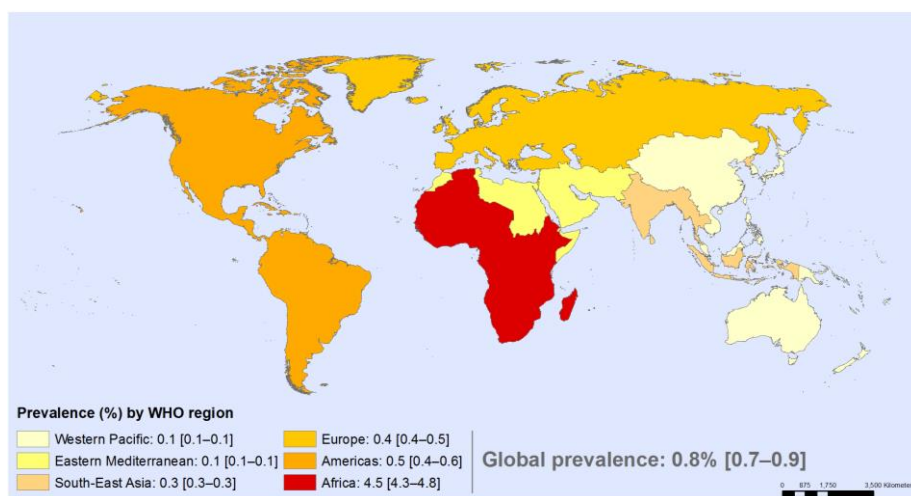


Figura 2. Prevalencia de infección por VIH en diferentes regiones del mundo en 2011.

Se muestra la prevalencia de infecciones por VIH en adultos y niños en las diferentes regiones del mundo. Tomado de (UNAIDS)

Desde los inicios de la epidemia, 60 millones de personas han sido infectadas por el virus, de las cuales cerca de 30 millones han fallecido por enfermedades relacionadas al SIDA (AVERT ; UNAIDS 2012). Según datos de junio de 2015, había 15.8 millones de personas en tratamiento. Globalmente, la enfermedad ha afectado por igual tanto a hombres como a mujeres, aunque hay regiones donde la epidemia se presenta con mayor prevalencia en las mujeres, como es el caso de África Sub-sahariana donde el 59% de las personas adultas infectadas son mujeres. Actualmente África Sub-sahariana continúa siendo una de las regiones más afectadas por la infección contribuyendo actualmente con el 69% de infecciones a nivel mundial.

El Caribe es la segunda región donde la proporción de mujeres supera a la de hombres en esta enfermedad, siendo del 53% para finales del 2010 (Figura 3). América Latina, Norte América, Europa Occidental y Europa Central son ejemplos de regiones en donde el porcentaje de mujeres infectadas ha disminuido en comparación con los datos del 2001(WHO).

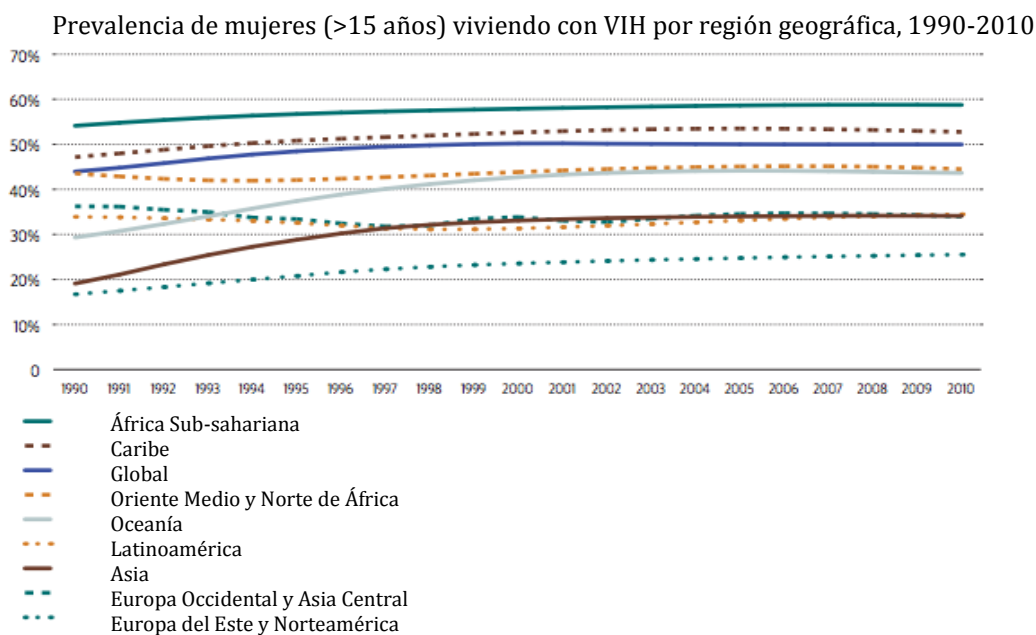


Figura 3. Prevalencia de mujeres (>15 años) viviendo con VIH por región geográfica, 1990-2010

Se muestran los datos de prevalencia de mujeres mayores de 15 años que viven con VIH por región geográfica en los periodos de 1990 al 2010. Tomado y modificado de (WHO)

Aunque se ha logrado disminuir el número de nuevos casos de infección, es necesario hacer avanzar la respuesta al SIDA. Para esto ONUSIDA ha desarrollado un enfoque de respuesta rápida para alcanzar un conjunto de objetivos con plazos definidos hasta el año 2020. Dentro de estos objetivos se quiere alcanzar que el 90% de todas las personas que viven con VIH conozcan su estado serológico respecto al VIH, que el 90% de las personas que sepan que tienen la infección tengan acceso al tratamiento y suprimir la carga viral del 90% de personas en tratamiento. También incluyen reducir las nuevas infecciones por el VIH en un 75% y alcanzar la cero discriminación.

Aunque estas nuevas políticas puedan ayudar a disminuir las infecciones a nivel global, las personas que actualmente viven con el virus siguen en la espera de una cura. La gran diversidad genética y capacidad adaptativa características del virus, aunadas a la notable variabilidad y complejidad de la respuesta inmunológica en las diferentes poblaciones del mundo, representan un reto enorme para el desarrollo de una vacuna efectiva contra el virus o bien una cura para la enfermedad. Es necesario poder profundizar en el conocimiento de la replicación del VIH, en las múltiples interacciones de los componentes virales con la maquinaria molecular de la célula hospedera y en las características particulares de la compleja inmunopatogénesis viral, así como en la identificación de las respuestas inmunes efectivas para el control del virus que podría llevar finalmente a la elucidación de estrategias útiles de control retroviral.

Adicionalmente, serán necesarios estudios comparativos enfocados a diferentes poblaciones infectadas para obtener un panorama más completo de la capacidad de adaptación del virus a diversas poblaciones humanas y sus posibilidades de evolución a nivel poblacional, llevando a una posibilidad más real de desarrollar una vacuna candidata efectiva para el control de la epidemia de VIH/SIDA o al desarrollo una estrategia inmunológica para una posible cura.

1.1 Panorama de la Infección por VIH en América Latina y México

Los países de América Latina se han visto afectados por la epidemia de VIH/SIDA en diferentes formas y grados. A pesar de las diferencias epidemiológicas individuales por país; la pobreza extrema, la migración, la homofobia y la discriminación siguen siendo factores comunes y barreras que impiden superar la crisis. A pesar de que la prevalencia en los países de América Latina es baja, comparada con las tasas observadas en muchas regiones de África, el número de personas afectadas sigue siendo substancial. En el 2014, había 1.7 millones de personas viviendo con VIH, con un estimado de 87,000 nuevas infecciones en la región. Las nuevas infecciones disminuyeron en un 17% entre el 2000 y el 2014. Entre el 2005 y el 2014, el número de muertes relacionadas al SIDA disminuyó en un 29%. Debido a la estrategia de las Naciones Unidas, actualmente el tratamiento antirretroviral tiene una cobertura del 47% entre los adultos de 15 años en adelante y en un 54% entre los niños de 0 a 14 años. Asimismo, hubo 100,000 nuevas infecciones por VIH en América Latina en el 2015 (UNAIDS).

El VIH y SIDA afectan la vida de millones de personas y, tienen implicaciones sociales y económicas en estos países. Los países con el mayor número de personas viviendo con VIH son: Brasil (810,000), México (190,000), Argentina (130,000), Colombia (120,000) y Venezuela (110,000). Sin embargo, debido a la gran cantidad de población en muchos de estos países, la prevalencia del VIH es baja, siendo menor al 1% en la mayoría de ellos. La epidemia más severa se encuentra en los países del caribe, donde la prevalencia del VIH es del 1.9% (UNAIDS). La prevalencia en grupos específicos, como en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y trabajadores sexuales, suele ser más alta.

En México, la epidemia parece estar concentrada en ciertos grupos como son HSH, las personas que usan drogas inyectables (UDI); así como hombres trabajadores sexuales (HTS) y en menor medida mujeres trabajadoras sexuales (MTS) y personas privadas de la libertad (PPL). La prevalencia en estos grupos de riesgo en nuestro país se de 16.99% para HSH, seguido de los HTS (18.24%), los UDI (7.0%) y finalmente las MTS (0.63%) (Figura 4) (Bautista-Arredondo 2012a; Bautista-Arredondo 2012b). De los casos de infección reportados, se estima que el 83% se presenta en hombres y que un 50% se concentra en sólo cinco entidades federativas: Distrito Federal, Estado de México, Veracruz, Jalisco y Puebla. Sin embargo, al considerar tasa de infección, ajustando por número total de habitantes en cada entidad

federativa, se ha observado que los estados más afectados por la epidemia son el Distrito Federal, seguido de Baja California, Yucatán, Morelos, Jalisco, Veracruz y Quintana Roo (CENSIDA 2012).

De los casos para los cuales se conoce la forma de transmisión se observa que la vía de transmisión sexual es predominante (92.5), con 46% de los casos a nivel nacional en HSH, llegando éstos a constituir el 63% en algunas zonas urbanas (CENSIDA 2012). La vía heterosexual de transmisión es más importante en zonas rurales que en zonas urbanas, con una razón de casos hombre/mujer de 4:1, en comparación con 6:1 en zonas urbanas(CENSIDA 2012)(Figura 5).

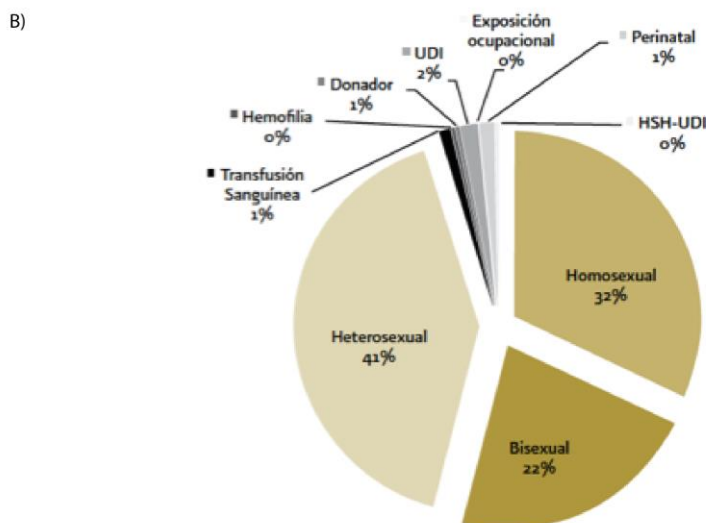
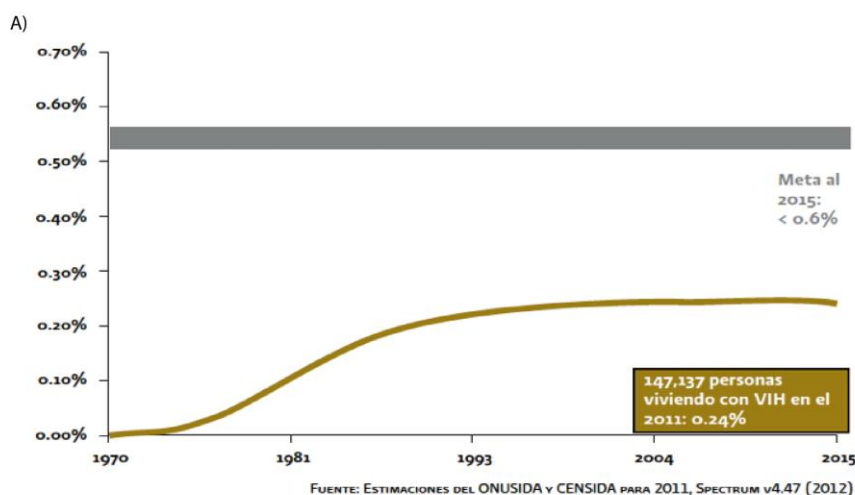


Figura 4. Prevalencia de infecciones por VIH en México.

A) Se muestra la prevalencia histórica de personas viviendo con VIH en México. B) Se muestra la prevalencia de infecciones por VIH en los diferentes grupos de riesgo en México. Tomado y modificado de (CENSIDA 2012)

Se ha observado un aumento en las conductas de riesgo en la población como lo son los cambios en las prácticas sexuales y el uso de drogas intravenosas. Sin embargo, la falta de información y la calidad deficiente de la información disponible, aunadas a la vulnerabilidad asociada a los grupos con mayor riesgo, como los migrantes, trabajadores sexuales y HSH, hacen difícil estimar el potencial de dispersión de la infección, así como su impacto en la población general, especialmente en el sector rural (Magis-Rodriguez 2008; Sanchez et al. 2004). Es por este motivo que es necesario mejorar los métodos de recolección de información, así como introducir nuevas herramientas que permitan un mejor monitoreo de las tendencias conductuales y del impacto de los programas de intervención (Calleja et al. 2002; Cohen 2006).

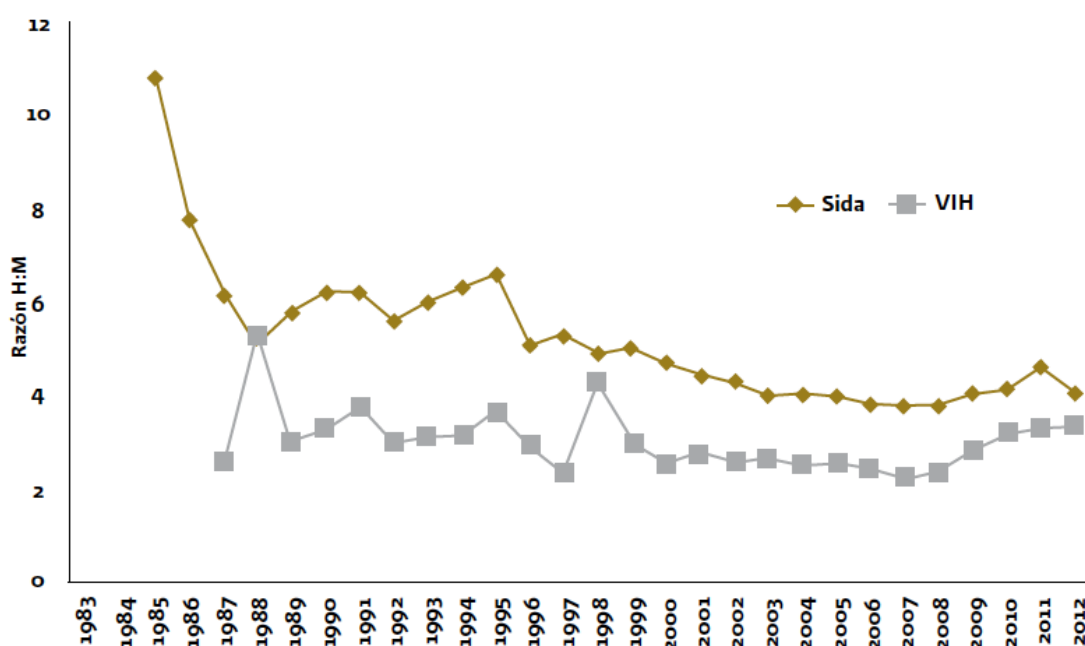


Figura 5. Razón Hombre/Mujer de casos seropositivos a VIH y de casos de SIDA (1983-2012).
Se muestra la razón hombre/mujer histórica de casos de infección por VIH en el México. Tomado de (CENSIDA 2012)

2. Componente genético de la población Mexicana

Los grupos étnicos originarios eran más numerosos en el centro y sur de México ya que contaban con una cohesión política, religiosa y social más sólida que los grupos étnicos del norte. En el año de 1521, con la llegada de los conquistadores españoles, se inicia la mezcla de dos razas: la amerindia y la europea que hasta ese momento habían estado separadas geográficamente por mucho tiempo. Durante los años 1545 y 1548, se trajeron esclavos negros a la región debido al notable descenso de la población amerindia causada por las epidemias (Gerhard 1986). Desde entonces, los procesos de mestizaje en regiones geográficamente distantes se han visto afectadas por diferentes condiciones demográficas e históricas que han modelado la estructura genómica actual de los mexicanos.

Estos factores han generado heterogeneidad genética entre y al interior de las diferentes regiones de todo México (Gorodezky et al. 2001; Martínez-Marignac et al. 2007; Rangel-Villalobos et al. 2008; Wang et al. 2008).

Ésta heterogeneidad observada en la población mestiza mexicana fue descrita por el grupo de Jiménez-Sánchez, J. y confirmada recientemente por el grupo de Bustamante, C. en donde determinaron que las diferencias observadas en la población se deben principalmente a diferencias en contribuciones ancestrales europeas (EUR) y amerindias (AMI). De esta forma, en las regiones centrales se observa un mayor porcentaje de componente amerindio perteneciente al grupo étnico Zapoteco; mientras que en las regiones del norte el componente europeo es más alto (Figura 6). En la población mexicana el componente ancestral africano es bajo en general, aunque en regiones como Veracruz y Guerrero es más elevado (Pereyra et al. 2010). La región del sureste en Yucatán está representada por los Mayas, grupo étnico geográficamente distante de otros grupos amerindios mexicanos y con marcadas diferencias culturales, sociales e históricas respecto a los otros grupos (Figura 6). Estos resultados correlacionan con la densidad poblacional amerindia pre-hispánica y actual en esas regiones, así como a los registros históricos de los puntos de entrada tanto de españoles como de esclavos africanos durante el período colonial.

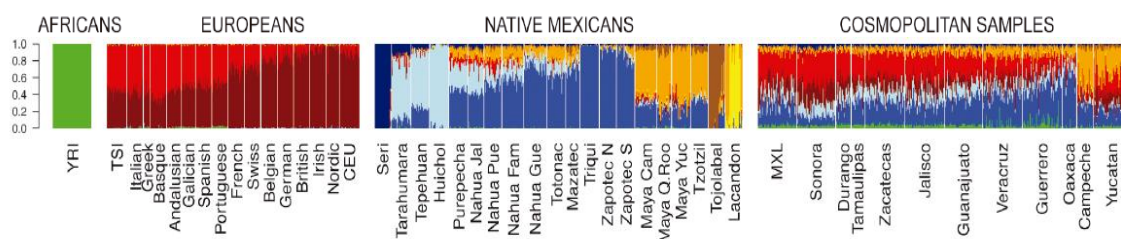


Figura 6. Componente ancestral de la población mexicana.

Cada barra horizontal representa las características genéticas de una persona. De color verde se muestran los individuos con ascendencia Africana (Yorubas, YRI), de color rojo se muestran los individuos con ascendencia Europea. Los nativos mexicanos están representados por los diferentes grupos étnicos los cuales se muestran por los colores azul fuerte para los grupos del norte, azul claro para los grupos indígenas del centro oeste, rojo para los grupos del centro este, verde para los grupos del sur y amarillos para los grupos del sureste. El panel de muestras contemporáneas hace referencia a los individuos mestizos mexicanos actuales donde se puede observar la heterogeneidad genética a lo largo del país. Tomado y modificado de (Moreno-Estrada et al. 2014)

La gran heterogeneidad genética observada en la población mexicana, hacen de esta una población ideal para estudios de análisis genómicos en enfermedades complejas. Esto se ha observado previamente en estudios de padecimientos como diabetes tipo 2 (Chen et al. 2012; Martínez-Marignac et al. 2007; Williams et al. 2014), hipertrigliceridemia (Aguilar-Salinas et al. 2014) o, densidad mineral ósea (Nuno-Arana et al. 2012) que afectan a la mayoría de la población y que muestran diferencias clínicas con respecto a otras poblaciones.

Es importante recalcar que aunadas a estas diferencias genéticas intrínsecas de la población, se encuentran las diferencias inmunogenéticas de las poblaciones que influyen en la capacidad de responder y defenderse ante las infecciones y el cáncer. En este trabajo doctoral se analiza la influencia inmunogenética sobre la infección por VIH.

3. Aspectos Generales del Sistema Inmunológico

Históricamente, la palabra inmunidad se refería a la protección contra una enfermedad infecciosa. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad forman el sistema inmunitario cuya función fisiológica es la defensa contra microorganismos infecciosos.

La respuesta colectiva y coordinada frente a sustancias extrañas se denomina respuesta inmunitaria, sin embargo, sustancias extrañas no infecciosas también pueden desencadenar respuestas inmunitarias. Por consiguiente, una definición más completa de la inmunidad es la de una reacción frente a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos y macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, con independencia de las consecuencias fisiológicas o patológicas de dicha reacción.

3.1 Inmunidad Innata y Adaptativa

La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata (también denominada inmunidad inespecífica o natural) comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares existentes antes de que se produzca la infección y que permiten responder con rapidez ante ésta. La inmunidad innata proporciona las primeras líneas de defensa frente a los microorganismos y responden esencialmente de la misma manera ante infecciones repetidas. Los principales componentes de la inmunidad innata consisten en:

- 1) barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales;
- 2) monocitos/macrófagos, células dendríticas, granulocitos (basófilos, neutrófilos, eosinófilos), linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*), y subtipos de células T ($\gamma\zeta$ y NK-T) (Figura 7)
- 3) proteínas de la sangre, que incluyen componentes del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación,
- 4) proteínas que reciben el nombre de citocinas, que regulan y coordinan numerosas actividades de las células de la inmunidad innata.

Existe otra forma de respuesta inmunitaria denominada inmunidad adaptativa que se produce como respuesta a la infección y se adapta a ésta. La inmunidad adaptativa se caracteriza por una especificidad precisa por distintas moléculas y una capacidad de recordar y responder con más intensidad a la exposición repetida a un mismo microorganismo. El sistema inmunitario adaptativo es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de sustancias microbianas y no microbianas, distinguiendo entre moléculas y microorganismos aun cuando estos estén muy relacionados entre sí, por esta razón, también se denomina inmunidad específica. Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos (Figura 7).

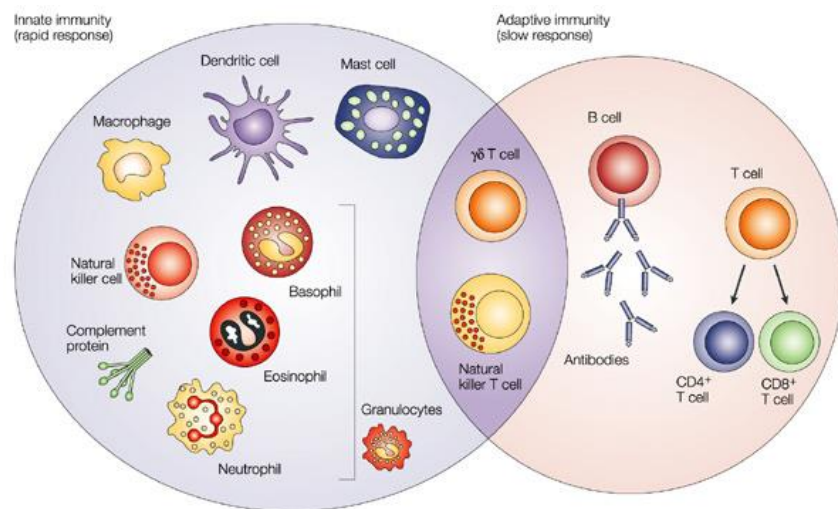


Figura 7. Células Sistema Inmune.

Células que forman parte del sistema inmune innato y adaptativo. Tomado de (Dranoff 2004)

La respuesta inmune innata y adaptativa son componentes de un sistema integrado de defensa del huésped en el que numerosas células y moléculas funcionan de forma cooperativa estableciendo una vinculación entre la inmunidad innata y la adaptativa. La respuesta innata a los microorganismos, estimula la inmunidad adaptativa e influye en la naturaleza de las respuestas adaptativas que se desarrollan. A su vez las respuestas inmunitarias adaptativas utilizan muchos de los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar a los microorganismos y suelen actuar aumentando la actividad innata.

En este trabajo doctoral nos enfocamos en un aspecto de la respuesta inmune innata contra células infectadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH); en el que participan los receptores KIR (tanto activadores como inhibidores) presentes en las células NK y su efecto en el control de la enfermedad tomando en cuenta factores genéticos intrínsecos de la población mestiza mexicana.

3.2 Células NK

Las células citolíticas naturales (NK por sus siglas en inglés, *Natural Killer*) fueron descritas originalmente como linfocitos granulares de gran tamaño con una actividad citotóxica natural en contra de tumores. Posteriormente, fueron reconocidas como un linaje separado de los linfocitos con funciones tanto de citotoxicidad como de inmuno-modulación (producción activa de citocinas) (Kiessling et al. 1975; Lanier et al. 1986). Las células NK constituyen aproximadamente el 10% de los linfocitos en sangre periférica y forman parte importante del sistema inmunológico innato. Al igual que los linfocitos T y B, las células NK se desarrollan a partir de un progenitor linfoide común; pero a diferencia de éstos los receptores expresados en superficie no se originan por recombinación somática sino que éstos pertenecen a diferentes familias de receptores innatos codificados en línea germinal.

El mecanismo citotóxico de las células NK es parecido al de las células T CD8⁺ y consiste en la liberación de gránulos, que contienen proteínas que permeabilizan la membrana de la célula blanco, permitiendo la entrada de proteínas efectoras que inducen la apoptosis (Henkart 1985; Russell and Ley 2002). Adicionalmente, expresan ligandos como TRAIL o CD95-L, que se unen a receptores de muerte en la superficie de las células blanco e inducen la apoptosis de dichas células (Kayagaki et al. 1999; Zamaï et al. 1998). La activación de éstas células está regulada por la integración de señales activadoras e inhibitoras que reciben al encontrarse con células blanco (Diefenbach and Raulet 2001; Lanier 1998; Moretta et al. 2001).

3.2.1 Subpoblaciones

Existen dos grandes subpoblaciones de células NK en humano, identificadas con base en la expresión diferencial de los marcadores CD16 (FcγRIII) y CD56 en los linfocitos CD3⁻, conocidas como CD16⁻ CD56^{bright} y CD16⁺ CD56^{dim} (Cooper et al. 2001a; Lanier et al. 1986) (Figura 8). Las células NK CD16⁻ CD56^{bright} y CD16⁺ CD56^{dim} se diferencian en fenotipo, capacidad funcional y localización preferencial. Las células NK CD16⁻ CD56^{bright} se encuentran en baja frecuencia en sangre periférica, mientras que son mayoría en nódulos linfáticos secundarios. Se han descrito preferencialmente como CD62L^{-LO} CD94/NKG2A⁺ CD62L^{HI} CD57⁻ KIR⁻ y son consideradas como inmuno-moduladoras debido a su potencial para producir grandes cantidades de citocinas como IFN-γ y TNF. En contraste, expresan pocos gránulos citolíticos y tienen poca capacidad citotóxica. Esta función es característica de las células NK CD16⁺ CD56^{dim}, las cuales también expresan grandes cantidades de granzima y perforina necesarias para la eliminación de células infectadas o que ha experimentado una transformación maligna.

Sin embargo, la idea que las células $CD16^- CD56^{bright}$ son productoras de citocinas mientras que las células $CD16^+ CD56^{dim}$ representan a las células citotóxicas puede ser erróneo ya que ambas subpoblaciones son capaces de producir grandes cantidades de $IFN-\gamma$. Las células NK $CD16^- CD56^{bright}$ producen grandes cantidades de $IFN-\gamma$ y proliferan en respuesta a las citocinas liberadas por las células dendríticas como IL-2, IL-15, IL-12 e IL-18 (Cooper et al. 2001b), pero son incapaces de producir $IFN-\gamma$ en respuesta al reconocimiento de una célula blanco (Fauriat et al. 2010; Juelke et al. 2010).

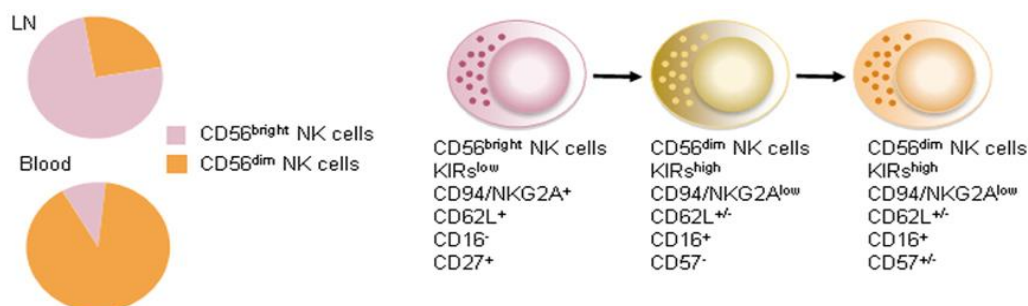


Figura 8. Subpoblaciones de células NK.

Durante el desarrollo de las células NK se pueden distinguir dos grandes subpoblaciones de células NK que se caracterizan principalmente por sus marcadores de superficie, aunque se ha visto que tienen localización preferencial. También se ha observado que las diferentes subpoblaciones presentan diferencias en los marcadores de superficie lo que ha dado pie al reconocimiento de nuevas subpoblaciones o bien estadios intermedios de las subpoblaciones bien definidas. Tomado y modificado de (Desbois et al. 2012) Desbois, M. *Frontier Immunol.* 2012.

Un análisis detallado de las propiedades funcionales y fenotípicas de $CD16^+ CD56^{dim}$ ha demostrado una alta heterogeneidad entre éstas células. Cuando éstas células fueron separadas de acuerdo a la expresión diferencial de CD62L, CD94/NKG2A o a la ausencia de CD57, se identificó una subpoblación funcional y fenotípica intermedia entre $CD16^- CD56^{bright}$ ($CD94/NKG2A^{hi} CD62L^{hi} CD57^-$) y $CD16^+ CD56^{dim} CD94/NKG2A^-, CD62L^-,$ o $CD57^+$ (Chan et al. 2007; Huntington et al. 2009; Im et al. 2012; Juelke et al. 2010; Lopez-Verges et al. 2010; Romagnani et al. 2007; Yu et al. 2010) (Figura 8). Estos datos han sido confirmados transcripcionalmente a nivel global (Juelke et al. 2010). Las células NK $CD16^+ CD56^{dim}$ con este fenotipo intermedio ($CD94/NKG2A^+, CD62L^+,$ o $CD57^-$) combinan la habilidad de producir $IFN-\gamma$ y de proliferar en respuesta a citocinas como las células NK $CD16^- CD56^{bright}$, con la capacidad de lisar y producir $IFN-\gamma$ después del reconocimiento de receptores activadores como las células $CD16^+ CD56^{dim}$. La relación entre las $CD16^- CD56^{bright}$ y las diferentes subpoblaciones de NK $CD56^{dim}$ ha sido controversial pero diversos estudios apoyan el concepto de que las células $CD16^- CD56^{bright}$ representan a las progenitoras de las células $CD16^+ CD56^{dim}$. Las células NK $CD16^- CD56^{bright}$ muestran telómeros más largos que las $CD16^+ CD56^{dim}$ y pueden adquirir la expresión de CD16 y KIR, al igual que otros marcadores, in vitro

e in vivo después de transfectarlas a ratones inmunodeficientes (Huntington et al. 2009; Juelke et al. 2010). Diversas observaciones han llevado a considerar un modelo linear de maduración, a partir de células más inmaduras $CD16^- CD56^{bright}$ hacia células NK terminalmente diferenciadas $CD16^+ CD56^{dim}$ ($CD94/NKG2A^-$, $CD62L^-$, o $CD57^+$) pasando por una subpoblación de células NK $CD16^+ CD56^{dim}$ con fenotipo intermedio ($CD94/NKG2A^+$, $CD62L^+$, o $CD57^-$) (Figura 8). Como ya se mencionó anteriormente, esta secuencia fenotípica está asociada con la pérdida progresiva de la capacidad de responder a citocinas y la adquisición gradual de la capacidad de responder al reconocimiento por receptores activadores (Chan et al. 2007; Juelke et al. 2010; Romagnani et al. 2007).

La capacidad de una subpoblación inmadura $CD16^- CD56^{bright}$ o de una subpoblación $CD16^+ CD56^{dim}$ de responder a citocinas correlaciona directamente con la expresión de $CD94$, $CD62L$ o $CD57$ y se caracteriza por una mayor expresión de receptores de citocinas y por la activación de $STAT4$ (Cooper et al. 2001a; Im et al. 2012; Juelke et al. 2010; Yu et al. 2010).

De forma contraria, la habilidad de la subpoblación $CD16^+ CD56^{dim}$ de lisar y producir $IFN-\gamma$, en respuesta a la unión de receptores activadores correlaciona, principalmente, con la expresión de receptores inhibidores específicos para las moléculas MHC de clase I propias. En humanos estos receptores son los KIR (del inglés Killer Immunoglobulin-like Receptors) o $CD94/NKG2A$ (Anfossi et al. 2006; Raulat and Vance 2006; Yokoyama and Kim 2006).

3.2.2 Función

Las células NK deben su nombre a la capacidad de mediar la citotoxicidad natural hacia ciertos tumores y células infectadas; pero como vimos anteriormente, la función de las células NK depende de cada subpoblación. Las células NK también son una fuente de producción de citocinas y quimiocinas como: $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-4$, $GM-CSF$, $TGF-\beta1$, $RANTES$ ($CCL5$), $MIP-1\alpha$ ($CCL3$) y $MIP-1\beta$ ($CCL4$) (Fauriat et al. 2010; Vivier et al. 2008; Yokoyama et al. 2004) (Figura 9). La producción de estos factores solubles por las células NK en las primeras etapas de la respuesta inmunológica influye en el reclutamiento y función de otras células hematopoyéticas. También favorecen la regulación de la respuesta inmunológica innata y adaptativa a través del contacto directo con otras células (Abul K. Abbas 2003; Ferlazzo and Munz 2004; Vivier et al. 2008)(Figura 10).

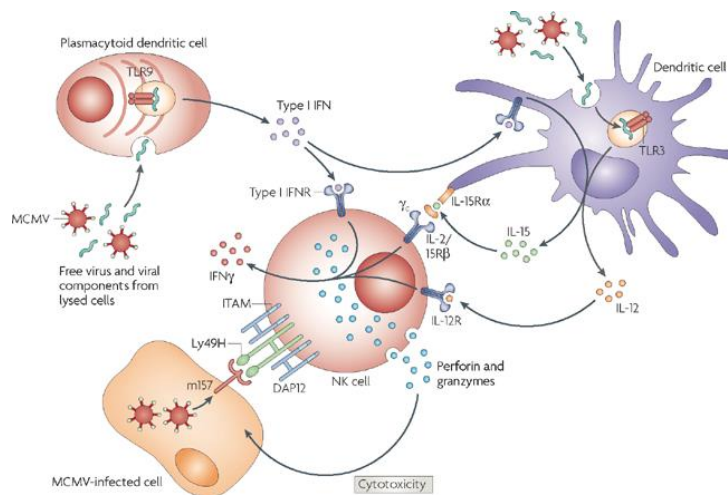


Figura 9. Funciones de las células NK

Dependiendo del balance de señales activadoras o inhibitoras que presenten las células NK, éstas son capaces de lisar células blanco mediante la liberación de granzima y perforina. También son capaces de modular la respuesta de otras células del sistema inmunológico innato (e.g. células dendríticas) mediante la liberación de citocinas. Tomado de (Lanier 2008)

La activación funcional de las células NK está mediada por la acción de receptores tanto activadores como inhibidores. La expresión de un repertorio amplio de receptores inhibidores regula principalmente la actividad citotóxica de las células NK. Algunos de éstos receptores inhibidores son específicos para las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), mientras que otros se unen a ligandos no MHC.

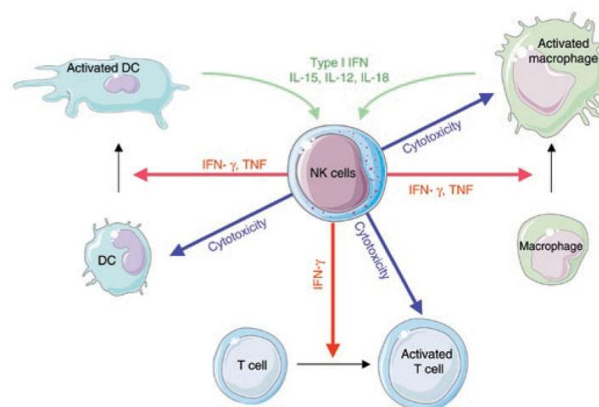


Figura 10. Regulación de la respuesta inmune

A partir de la activación por diversos factores solubles, las células NK pueden incrementar (flechas rojas) la maduración y activación de las células dendríticas, macrófagos y células T a través de la liberación de citocinas y la expresión de diversos receptores de superficie. De la misma manera, las células NK son capaces de lisar (flechas azules) células dendríticas inmaduras, células T CD4+ activadas y macrófagos hiperactivados. Todas estas funciones de regulación se mantienen bajo el reconocimiento constitutivo de moléculas propias como son las moléculas del MHC de clase I reconocidas por receptores inhibidores (e.g. KIR inhibidores en humano, Ly49 en ratón y CD94-NKG2D en ratón y humano). Tomado de (Vivier et al. 2008)

Algunos de estos receptores tales como los receptores KIR y los receptores de leucocitos parecidos a inmunoglobulinas (LILR, *Leukocyte Immunoglobulin.like receptors*), son glicoproteínas monoméricas de tipo I pertenecientes a la súper familia de las inmunoglobulinas, mientras que otros como el receptor Ly49 y CD94-NKG2A, son glicoproteínas tipo II con una lectina tipo C. Aunque estos receptores difieren en sus dominios extracelulares, comparten el motivo ITIM de señalización en su región citoplasmática. El motivo ITIM, se define por la secuencia (I/L/V)SXYXX(L/V), donde la X representa cualquier aminoácido y las barras inclinadas separan los aminoácidos que pueden ocupar esa posición. Cuando el receptor ITIM se ancla a su ligando, el residuo de tirosina es fosforilado por una cinasa de la familia de las Src, resultando en el reclutamiento de la fosfatasa lipídica SHIP-1 (la cual degrada el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato en fosfatidilinositol-3,4- difosfato) o a las fosfatasas de tirosina SHP-1 o SHP-2 (Figura 11) (Ravetch and Lanier 2000). El receptor inhibidor recluta estas fosfatasas a la región transmembranal correspondiente a la zona de contacto entre la célula NK y la célula blanco. Estas fosfatasas de tirosina suprimen las respuestas de la célula NK mediante la desfosforilación del sustrato de proteínas tirosin cinasa que se encuentra anclado al receptor activador. Estas fosfatasas son capaces de cancelar el flujo de Ca²⁺, la degranulación, la producción de citocinas y la proliferación de las células NK. Estos eventos son transitorios y localizados espacialmente, de forma que no interfieren con la habilidad de la misma célula de activarse si llegara a encontrarse con una célula blanco que no expresa ligandos para los receptores inhibidores.

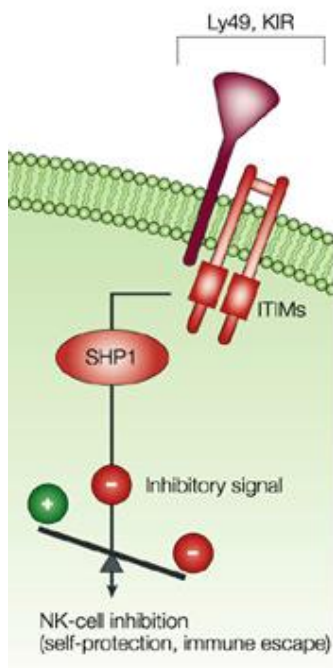


Figura 11. Receptores inhibidores anclados a ITIM
 Los receptores inhibidores (e.g. Ly49 en ratón y KIR en humano), se encuentran anclados a motivos ITIM los cuales regulan la cascada de señalización de SHP1 para dar la señal de inhibición. Tomado y modificado de (Smyth et al. 2002)

Adicionalmente a la actividad funcional mediada por los receptores inhibidores, las células NK cuentan con receptores activadores o co-estimuladores. Estos forman parte del balance de señales necesarias para la activación de las células. Las células NK maduras expresan constitutivamente proteínas de anclaje transmembranal tipo I como son FcεRI-γ, CD3-ζ y DAP12 que forman homodimeros unidos por un enlace disulfuro o, en el caso de FcεRI-γ y CD3-ζ heterodimeros. Todos tienen regiones extracelulares mínimas que comprenden pocos aminoácidos, principalmente los residuos de cisteína de donde son dimerizados. Estas proteínas contienen motivos activadores basados en tirosina (ITAM), que se definen por la secuencia (D/E)XXYXX(L/I)X₆₋₈YXX(L/I), en donde X₆₋₈ hace referencia a 6 u 8 aminoácidos cualquiera entre los dos elementos YXX(L/I) en su dominio citoplasmático (Figura 12). DAP-12 y FcεRI-γ presentan un ITAM, mientras que CD3-ζ presenta tres por cadena. Hasta el momento no se conocen otros motivos de señalización en las colas cortas de estas proteínas, y una mutación en los residuos de tirosina del ITAM suprime su función de señalización. Usualmente, las subunidades del motivo ITAM y sus receptores se unen mediante aminoácidos con cargas opuestas en sus regiones transmembranales. Todas las proteínas del motivo ITAM poseen en su región transmembranal un residuo de aspartato. Éste residuo cargado está localizado centralmente en la región transmembranal de DAP12 pero cercano a la región extracelular en FcεRI-γ y CD3-ζ, y es requerido para mantener una asociación estable con los receptores, los cuales usualmente contienen un aminoácido con carga opuesta (como lisina o asparagina) localizado en la misma porción de la región transmembranal. La cascada de señalización río abajo de las subunidades DAP12, FcεRI-γ y CD3-ζ, es parecida a la vía de señalización de los receptores de antígeno de las células T y B. La unión de éstos receptores provoca la fosforilación de las tirosinas ITAM, mediante la familia de cinasas Src. Después de la fosforilación, las subunidades ITAM se unen a la tirosin cinasa Syk y ZAP70. En el ratón, Syk puede ser la cinasa predominante, mientras que en humanos ambas parecen funcionar eficientemente en las subunidades ITAM (McVicar et al. 1998).

La activación de los motivos ITAM induce la reorganización de las actinas en el citoesqueleto para favorecer la polarización de la célula y la liberación de los gránulos citolíticos que contienen perforina y granzima y cuyo resultado es la transcripción de diversos genes de citocinas y quimiocinas. Después de la activación, el complejo del receptor CD16 es poliubiquitinizado y degradado en los lisosomas y proteosomas por un proceso que involucra la acción de la ligasa c-Cbl E3 (Paolini et al. 2001).

La señalización del receptor CD16 está regulada negativamente por el reclutamiento de SHIP a la subunidad fosforilada CD3- ζ (Galandrini et al. 2002). La función de otros receptores activadores de las células NK con motivo de señalización ITAM no se ha investigado a profundidad, son necesarios más estudios para entender como la cascada de señalización se regula y termina. También es necesario comparar directamente la señalización inducida a través de los receptores asociados a DAP12 contra los receptores asociados a Fc ϵ RI- γ y/o CD3- ζ en la misma clona de células NK para poder determinar si los eventos río abajo son iguales o tienen propiedades específicas de adaptadores.

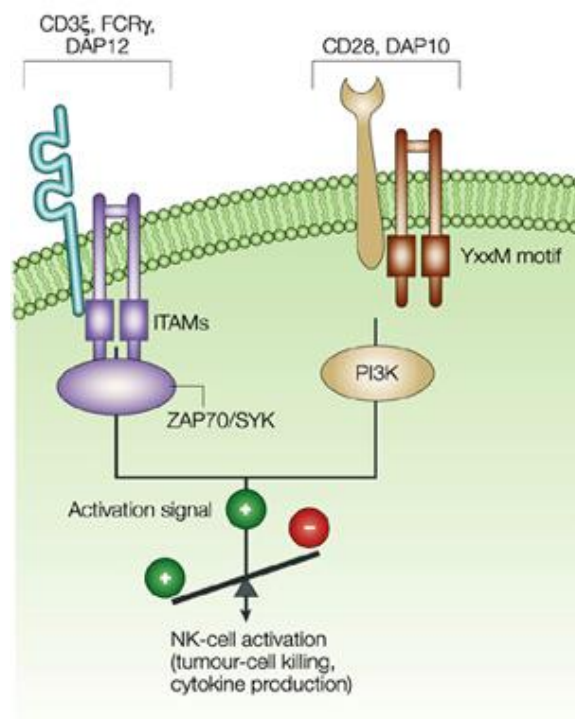


Figura 12. Receptores activadores anclados a motivos ITAM

Los receptores activadores de las células NK se encuentran anclados a motivos ITAM los cuales dan la señalización de activación (citotoxicidad o producción de citocinas) mediante la cascada de señalización de ZAP70/SYK. Tomado y modificado de (Smyth et al. 2002)

3.2.3.1 Receptores de Muerte parecidos a Inmunoglobulinas (KIR, Killer immunoglobulin-like receptors)

Los receptores de muerte parecidos a inmunoglobulinas (KIR) son miembros de un grupo de moléculas reguladoras que se encuentran en un subgrupo de células linfoides. Se identificaron por primera vez por su capacidad de proveer cierta especificidad a las células NK (Harel-Bellan et al. 1986; Moretta et al. 1990). La familia de genes KIR están codificados en 100 a 200 kB de la región del complejo de receptores leucocitarios (LRC, Leukocyte Receptor Region) localizado en el cromosoma 19 (19q13.4)(Trowsdale 2001), dispuestos en forma de tándem (Figura 14). El LRC constituye un grupo grande (1Mb) y denso de genes inmunológicos con una rápida evolución (Khakoo et al. 2000). Contiene genes que codifican para moléculas de superficie con dominios extracelulares distintivos parecidos a inmunoglobulinas. Estos genes incluyen del centrómero al telómero, lectinas parecidas a inmunoglobulinas con unión a ácido siálico (SIGLEC), receptores leucocitarios parecidos a inmunoglobulinas (LiLR) y receptores parecidos a inmunoglobulinas asociados a leucocitos (LAIR), también FcγR así como el Receptor 1 de activación citotóxica de células NK (NCR1) (Trowsdale et al. 2001; Wilson et al. 2000). Aunado a esto el LRC contiene genes que codifican para los miembros de la familia CD66 como lo son las moléculas adaptadoras transmembranales DAP10 y DAP12 (Hsu et al. 2002).

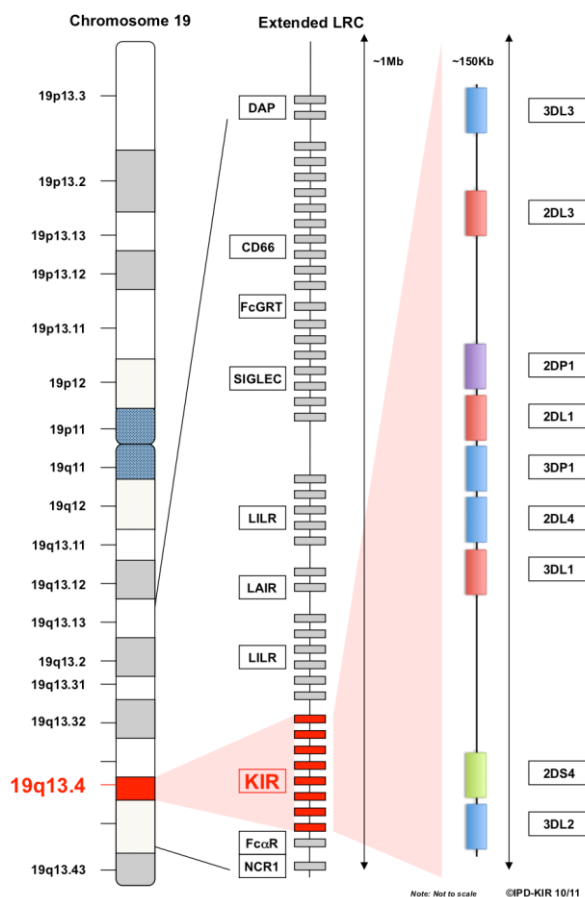


Figura 14.Región de receptores leucocitarios (LRC)

Los receptores de muerte parecidos a inmunoglobulinas (KIR) se encuentran localizados en el cromosoma 19, dentro del LRC junto con otras familias de receptores. Tomado de <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>

Se han identificado 15 genes KIR que se expresan en la superficie de las células NK (Tabla 1), por lo que se generaron dos sistemas para nombrarlos. La nomenclatura más usada es aquella basada en la estructura de la proteína y consiste en 4 subdivisiones basadas en dos características: el número de dominios Ig extracelulares (2D o 3D) y la característica de la cola citoplasmática (Figura 15) (HGNC ; Marsh et al. 2003). También se han nombrado de acuerdo al sistema de nomenclatura CD como CD158a, CD158b, etc., basado aproximadamente en el orden centromérico - telomérico de los genes en el cromosoma 19 (Andre et al. 2001). Desgraciadamente, la nomenclatura CD no refleja estructura, función, expresión o localización (Hsu et al. 2002). Este sistema también presenta la posibilidad de confusión con anticuerpos monoclonales, CD158a y CD158b. Debido a que el sistema de nomenclatura CD no es usado de forma rutinaria, a partir de ahora en adelante sólo utilizaremos la nomenclatura del sistema HUGO (HGNC).

Independientemente del número de subunidades de Ig extracelular observadas en los genes KIR, el dominio citoplasmático puede ser largo (“L”) o corto (“S”). Los genes KIR con dominios citoplasmáticos largos son principalmente inhibidores debido a la presencia de motivos de inmunorreceptores inhibidores basados en tirosina (ITIMs). Los genes KIR con dominios cortos citoplasmáticos transmiten señales activadoras a través de su interacción con la molécula adaptadora DAP-12 (proteína de activación DNAX de 12 kD, también conocida como molécula activadora de proteína asociada a receptor de célula de muerte o KARAP), que contiene un motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina (ITAMs)(Blery et al. 2000; Lanier et al. 1998). DAP-12 también es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y es codificado en la parte final centromérica del LRC.

Se han identificado dos pseudogenes KIR (2DP o 3DP): 2DP1, comparte similitudes con genes los KIR con dos dominios extracelulares mientras que 3DP1, es similar a 3DL3 en algunas porciones y puede representar un gen KIR ancestral.

Tabla 1. Nombres de los Receptores de Muerte parecidos a Inmunoglobulinas (KIR)

| Símbolo | Nombre | Alias |
|----------------|--|---|
| KIR2DL1 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola larga citoplasmática, 1 | cl-42, nkat1, 47.11, p58.1, CD158a |
| KIR2DL2 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola larga citoplasmática, 2 | cl-43, nkat6, CD158b1 |
| KIR2DL3 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola larga citoplasmática, 3 | cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58, CD158b2 |
| KIR2DL4 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola larga | 103AS, 15.212, CD158d |

| | | |
|----------|---|--|
| | citoplasmática, 4 | |
| KIR2DL5A | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola larga citoplasmática, 5A | KIR2DL5.1, CD158f |
| KIR2DL5B | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola larga citoplasmática, 5B | KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4 |
| KIR2DS1 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola corta citoplasmática, 1 | EB6ActI, EB6ActII, CD158h |
| KIR2DS2 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola corta citoplasmática, 2 | cl-49, nkat5, 183ActI, CD158j |
| KIR2DS3 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola corta citoplasmática, 3 | nkat7 |
| KIR2DS4 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola corta citoplasmática, 4 | cl-39, KKA3, nkat8, CD158i |
| KIR2DS5 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, cola corta citoplasmática, 5 | nkat9, CD158g |
| KIR2DP1 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, dos dominios, pseudogen, 1 | KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6 |
| KIR3DL1 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, tres dominios, cola larga citoplasmática, 1 | cl-2, NKB1, c1-11, nkat3, NKB1B, AMB11, KIR, CD158e1 |
| KIR3DL2 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, tres dominios, cola larga citoplasmática, 2 | cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b, CD158k |
| KIR3DL3 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, tres dominios, cola larga citoplasmática, 3 | KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z |
| KIR3DS1 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, tres dominios, cola corta citoplasmática, 1 | Nkat10, CD158e2 |
| KIR3DP1 | Receptor de muerte parecido a inmunoglobulinas, tres dominios, pseudogen, 1 | KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P, CD158c |

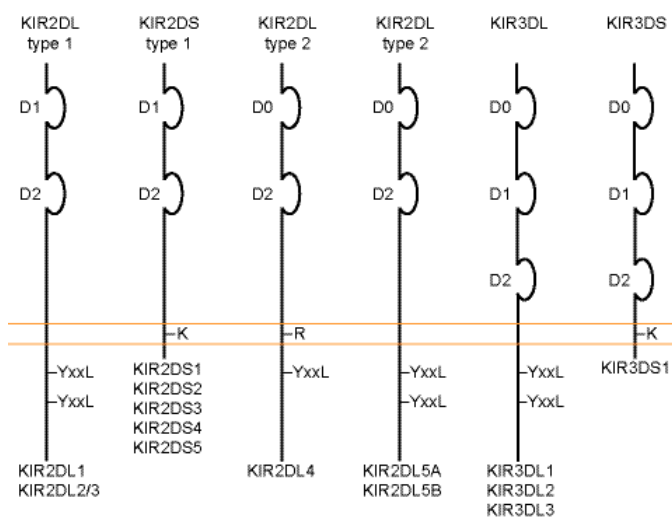


Figura 15. Estructura de los dominios de las moléculas KIR

Los genes KIR son miembros de la familia de Ig que expresan 2 o 3 dominios extracelulares parecidos a inmunoglobulinas (Ig).

Los genes KIR miden de 4 a 16 Kb (secuencia genómica completa) y contienen de cuatro a nueve exones. La estructura exón-intrón de varios genes KIR es consistente siguiendo el arreglo básico: la secuencia señal está codificada por los primeros dos exones, cada dominio Ig (D0, D1 y D2, empezando por la N-terminal) está codificado en un solo exón (exón 3-5, respectivamente), cada una de las regiones de enlace y transmembranal están codificadas por un solo exón (exón 6 y 7), y el dominio citoplasmático está codificado por los exones finales (Figura 16)(Trowsdale et al. 2001; Wilson et al. 2000; Wilson et al. 1997).

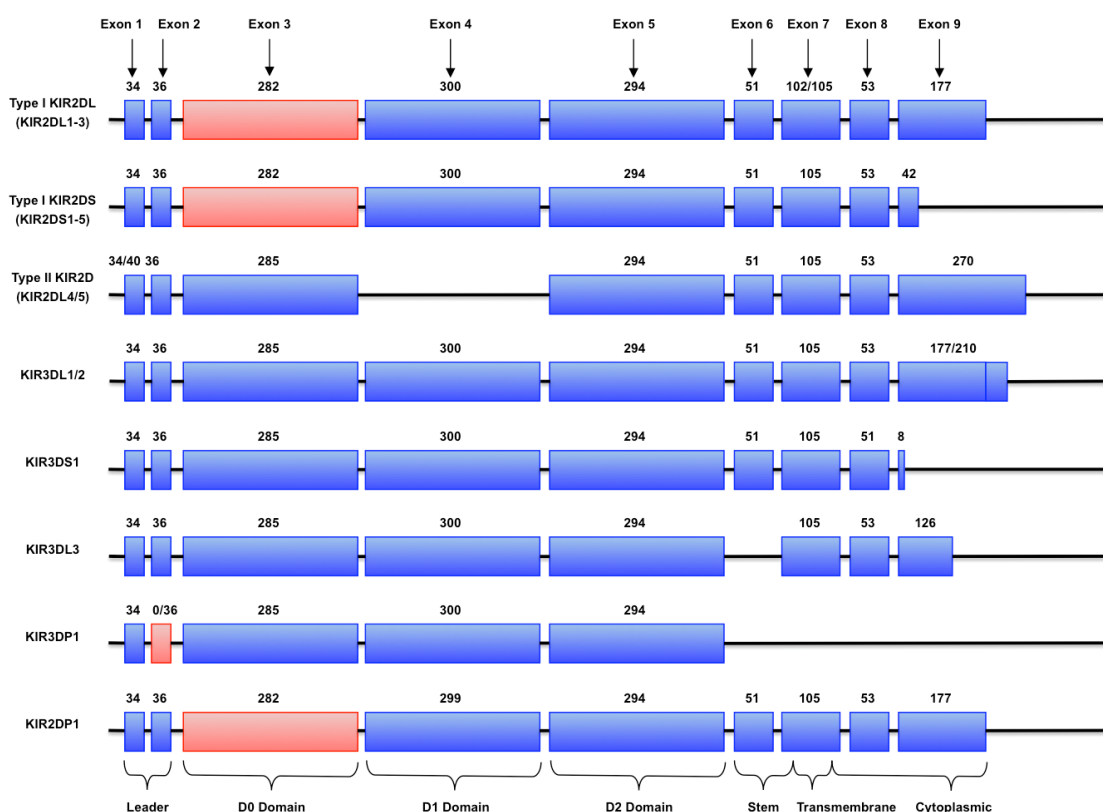


Figura 16. Estructura exón-intrón de los genes KIR y su relación con los dominios de la proteína

Los genes KIR comparten estructuras similares en su organización lo que ha permitido agruparlos de acuerdo a sus características. Los exones codificantes se muestran en azul y el tamaño se muestra con un número encima de cada caja. El pseudoexón 3 y el exón deletado de KIR3DP1 se muestran en rojo. En la parte inferior se muestran las llaves que ilustran la relación entre el o los exones y el dominio o los dominios. Tomado de <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>

Los genes KIR se han clasificado de acuerdo a sus características estructurales en cuatro grupos (Figura 17):

- 1) Genes KIR2D de tipo 1, codifican para dos proteínas extracelulares con conformación D1 y D2;
- 2) Genes KIR2D de tipo 2, estructuralmente divergentes ya que codifican para dos dominios extracelulares con conformación D0 y D2.

3) Genes KIR3D que codifican para 3 dominios extracelulares parecidos a inmunoglobulinas (D0, D1 y D2)(Barrow and Trowsdale 2008).

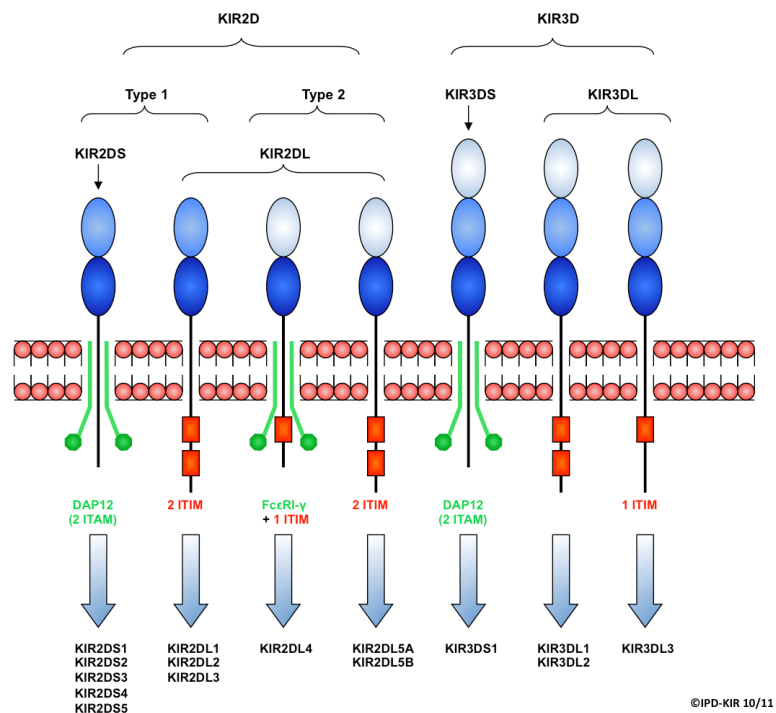


Figura 17. Clasificación de los genes KIR

Se muestran las características estructurales de dos y tres dominios parecidos a Ig en las proteínas KIR. La asociación de moléculas adaptadoras a los KIR activadores se muestra en verde, mientras que los ITIM de los KIR inhibidores se muestran en rojo. Tomado de <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>

Los genes KIR2D de tipo 1 que incluyen al pseudogen KIR2DP1, así como a los genes KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4 y KIR2DS5; poseen ocho exones y un pseudoexón (Colonna and Samaridis 1995; Vilches and Parham 2002; Wagtmann et al. 1995). Este pseudoexón es inactivo en los KIR2D de tipo 1, en algunos casos esto se debe a una sustitución nucleotídica localizada en el sitio de corte entre el intrón 2 y el exón 3. La secuencia nucleotídica exhibe una alta homogeneidad con las secuencias del exón 3 de los genes KIR3D y posee una delección de tres pares de bases (Vilches et al. 2000a). Dentro de los genes KIR2D de tipo 1, los genes KIR2DL1 y KIR2DL2 comparten la delección de una base en el exón 7, por lo que la secuencia de este exón es más pequeña a diferencia de los demás genes KIR. Los genes KIR2DL1, -2DL2 y -2DL3 difieren de los genes KIR2DS1, -2DS2, -2DS3, -2DS4 y -2DS5, sólo en la longitud de la región que codifica la cola citoplasmática en el exón 9. El pseudogen KIR2DP1 presenta una secuencia más corta en el exón 4, debido a la delección de una base, esto lo diferencia de los genes KIR2DL1, -2DL2 y -2DL3 (Vilches et al. 2000b).

Los genes KIR de tipo II incluyen a KIR2DL4 y KIR2DL5. A diferencia de los genes KIR3D y KIR2D de tipo I, los genes KIR2D de tipo 2 tienen como característica la ausencia del exón 4. Aunado a esto, los genes KIR2D de tipo II difieren de los de tipo I en que tienen un exón 3 codificante mientras que los del tipo I poseen un pseudoexón 3 no codificante (Vilches et al. 2000b; Vilches et al. 2000c). Dentro de los genes KIR2D de tipo II, el KIR2DL4 se diferencia del KIR2DL5 (al igual que de otros genes KIR) por el tamaño de la secuencia del exón 1. En el gen KIR2DL4, el exón 1 presenta 6 nucleótidos más y posee un codón de iniciación diferente al que se presenta en otros genes KIR. Este codón de iniciación es más parecido a la secuencia consenso Kozak de transcripción (Selvakumar et al. 1996) que el codón de iniciación presente en el resto de los genes KIR (Vilches et al. 2000c).

Los genes KIR3D poseen 9 exones e incluyen a los genes estructuralmente relacionados KIR3DL1, -3DS1, -3DL2 y -3DL3. La secuencia nucleotídica de KIR3DL2 es la más larga de todos los genes KIR siendo de 16,256 bp en secuencia genética completa y de 1,368 bp en cDNA. Los cuatro genes KIR3D, difieren en la longitud del exón 9 que codifica para la cola citoplasmática (Dohring et al. 1996a; Kozak 1986; Vilches and Parham 2002). La longitud de las colas citoplasmáticas de las proteínas KIR varía de 23 residuos de aminoácidos de largo (en los alelos del gen KIR3DS1) a 116 residuos de aminoácidos de largo (en la proteína de KIR2DL4). Adicionalmente, KIR3DS1 difiere de KIR3DL1 o KIR3DL2 en que tiene una secuencia más corta en el exón 8. La secuencia de KIR3DL3 difiere de otros genes KIR ya que le falta por completo el exón 6. La mayor cantidad de diferencias observadas en los genes KIR es en el KIR3DP1 (Torkar et al. 1998). Este gen carece por completo del exón 6 al exón 9, y en algunas ocasiones también el exón 2 no existe. Las porciones restantes que tiene el gen (exón 1, 3, 4 y 5) comparten una alta homogeneidad con los demás genes KIR3D, en particular con KIR3DL3.

Los genes KIR están situados en un segmento del DNA que ha sufrido de expansiones y contracciones a lo largo del tiempo. Una inspección a los haplotipos sugiere la duplicación de genes y un entrecruzamiento desigual en la región.

Los genes están organizados de forma consecutiva, y cada gen tiene una longitud en su secuencia de 10-16 kb con una separación de 2 kb entre ellos, a excepción de la separación observada para KIR2DL4 que es de 14 kb. La variación en el complejo de los genes KIR está en función tanto del polimorfismo alélico de diversos genes KIR como de la variabilidad en número y tipo de genes presentes en cada haplotipo (Crum et al. 2000; Norman et al. 2001; Selvakumar et al. 1997; Shilling et al. 2002a; Uhrberg et al. 1997; Witt et al. 1999).

Los genes KIR2DL4, -3DP1, -3DL2 y -3DL3 están presentes en todos los haplotipos y son considerados genes constitutivos (Wilson et al. 2000). El resto de los genes existen solo en una fracción del total de haplotipos. El número de genes expresados en cada haplotipo varía de 7 a

12 genes, dependiendo de la presencia o ausencia de genes KIR activadores (Uhrberg et al. 1997; Wilson et al. 2000; Witt et al. 1999).

El orden de los genes KIR a lo largo del cromosoma ha dado pie a la identificación de dos haplotipos diferentes (Wende et al. 1999; Wende et al. 2000; Wilson et al. 2000), el A y el B que fueron originalmente diferenciados por la presencia de un fragmento de HindIII de 24 kb en los análisis de Southern Blot (Uhrberg et al. 1997)(Figura 18). El haplotipo A presenta 7 genes: KIR2DL1, -2DL3, -2DL4, -2DS4, -3DL1, -3DL2 y -3DL3. La diferencia entre el haplotipo A y el B está en el número de genes activadores presentes. El haplotipo A sólo presenta un gen activador (KIR2DS4), sin embargo el gen 2DS4 presenta un alelo nulo con una frecuencia poblacional del 84% (Maxwell et al. 2002). Por lo que algunos individuos homocigotos para el haplotipo A no tiene genes KIR activadores presentes. El haplotipo B puede presentar diversas combinaciones de genes activadores (KIR2DS1, -2DS2, -2DS3, -2DS5, -3DS1 y -2DS4).

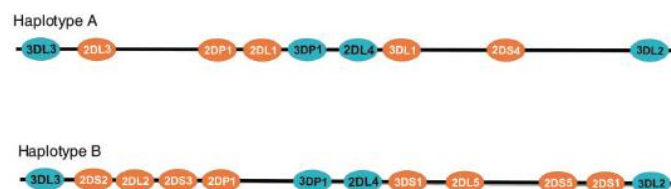


Figura 18. Haplotipos KIR

Se muestra un ejemplo de cada uno de los haplotipos KIR. Los genes constitutivos se muestran en azul. Los genes presentes en cada uno de los haplotipos se muestran en naranja. La diferencia principal entre ambos haplotipos es la presencia de genes activadores. El haplotipo A sólo presenta un gen activador (2DS4) mientras que la cantidad de genes activadores en el haplotipo B varía. Tomado y modificado de (Salim et al. 2011)Salim, P.H.; Rev. Bras. Reumatol. 2011

Los genes KIR se expresan en células NK y algunas subpoblaciones de células T (Falk et al. 1995; Mingari et al. 1997). Las clonas de las células NK de un individuo varían sustancialmente en el tipo de moléculas KIR que expresan. Cada célula requiere al menos de un receptor inhibitor, de tal forma que si no se presenta la combinación adecuada receptor inhibitor KIR – ligando, otras interacciones con otros tipos de receptores inhibidores pueden compensar esta falta (Gumperz et al. 1996; Raulet et al. 2001; Shilling et al. 2002b; Valiante et al. 1997).

Con la excepción de los alelos nulos y posiblemente de KIR3DL3, todos los genes KIR en el repertorio de un individuo se expresan, aparentemente de forma estocástica lo que favorece un gran número de patrones de expresión de KIRs en las diferentes células NK (Husain et al. 2002; Uhrberg et al. 2001; Valiante et al. 1997). En individuos heterocigotos, las clonas de células NK pueden o no expresar uno o los dos alelos de 3DL1 y 3DL2, pero siempre van a expresar las dos copias de 2DL4 (Chan et al. 2003).

Esta diversidad somática permite que al menos una población clonal de células NK sea capaz de responder a la regulación negativa de al menos un alelo del MHC de clase I (Carr et al. 2002; Pietra et al. 2000; Vilches and Parham 2002). La expresión de KIR involucra cerca de 15 transcritos diferentes que están localizados a 500 bp de la región 5' del codón de inicio (Trowsdale et al. 2001). Otros mecanismos para controlar los niveles de KIR incluyen la regulación en la expresión de citocinas así como de hormonas (Mingari et al. 2000; Ponte et al. 1999). Aunque hay diversos factores que pueden afectar la expresión de KIR, los niveles a largo plazo parecen estables (Shilling et al. 2002b).

Los ligandos para los genes KIR son principalmente moléculas del MHC de clase I, en particular las moléculas clásicas (principalmente HLA-A, -B y -C). Esto se ha observado gracias a estudios que midieron la unión de receptores inhibidores a moléculas específicas de HLA, así como a la inhibición de la lisis mediada por las células NK a células que poseían esos grupos alélicos HLA (Long and Rajagopalan 2000; Sawicki et al. 2001; Vilches and Parham 2002). Dimorfismos observados en el dominio $\alpha 1$ del HLA-C que se caracterizan por: a) la presencia de una serina (Ser) en la posición 77 y una asparagina (Asn) en la posición 80 o, b) de una asparagina (Asn) en la posición 77 y una lisina (Lys) en la posición 80; lo que permite diferenciar dos grupos de HLA-C: siendo C1 y C2 respectivamente. Los genes KIR2DL1 y 2DS1 interactúan con los HLA-C del grupo 2 mientras que 2DL2, 2DL3 y 2DS2 interactúan con el grupo 1 (Bianconi et al. 1995; Colonna et al. 1992; Winter and Long 1997). La especificidad para cada grupo HLA-C, está definida por una sola sustitución en la posición 44 del gen KIR2D (Richardson et al. 2000; Winter and Long 1997). Las células NK que expresan receptores específicos sólo para C2 pueden lisar células blanco que son homocigotas para el grupo 1 de HLA-C y viceversa.

El gen KIR3DL1 interactúa con las moléculas HLA-B que tienen el motivo serológico Bw4 (Cella et al. 1994; Gumperz et al. 1995) y KIR3DL2 interactúa con algunos alelos HLA-A (Dohring et al. 1996b; Pende et al. 1996). Hasta el momento no se conoce que algún KIR interactúe con moléculas HLA que contengan el motivo serológico Bw6. Los motivos serológicos Bw4 y Bw6 pueden distinguirse por los polimorfismos observados en la posición 70, así como en las posiciones 80-83 del dominio $\alpha 1$ (Muller et al. 1989).

El gen KIR2DL4, al parecer es el único gen KIR que interactúa con moléculas no clásicas del MHC de clase I, siendo el HLA-G su ligando (Cantoni et al. 1998; Ponte et al. 1999; Rajagopalan and Long 1999). Un resumen de las interacciones observadas entre los genes KIR y sus ligandos se muestra en la Figura 19.

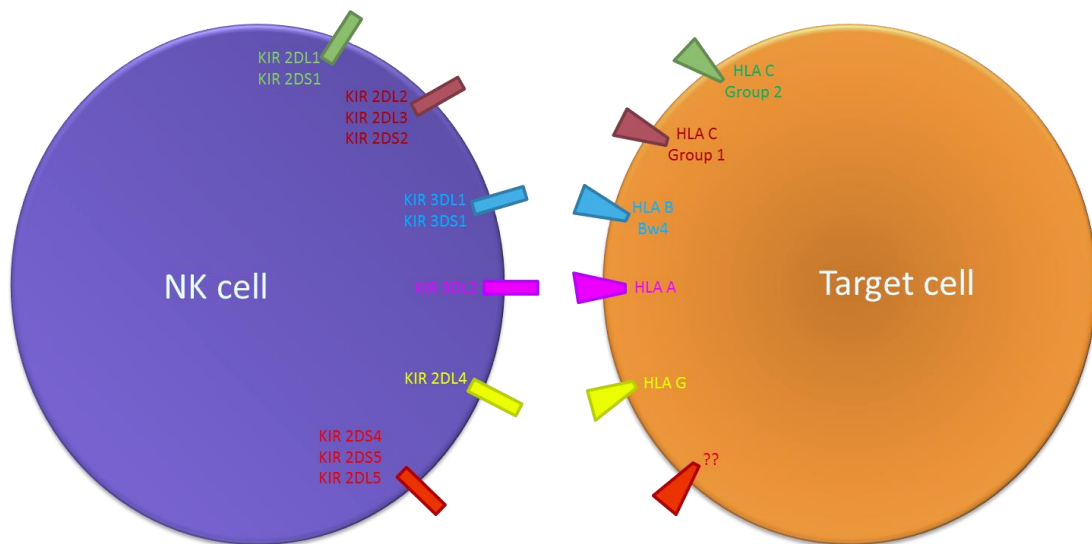


Figura 19. Genes KIR con su respectivo ligando
 Se muestran los genes KIR con sus respectivos ligandos conocidos hasta el momento. Modificado de (Salim et al. 2011)

3.3 Las células NK en la enfermedad: el papel del HLA y KIR

La participación de las células NK en diferentes enfermedades se ha estudiado con detenimiento. Enfermedades autoinmunes, padecimientos inflamatorios, tumores, infecciones virales tales como: infecciones por el virus de la hepatitis C, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), herpesvirus, micobacterias, y protozoarios; son ejemplos de estudios en donde se ha demostrado que las células NK juegan un papel importante.

En las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha visto que los genes KIR3DL1 y KIR3DS1 en combinación con su ligando HLA-Bw4, particularmente aquellos con isoleucina en la posición 80 (Cella et al. 1994; Gumperz et al. 1995) se asocian a una progresión lenta a SIDA, a una carga viral promedio menor y a protección contra las enfermedades oportunistas (Carr et al. 2005; Martin et al. 2002; Qi et al. 2006). Estudios funcionales han demostrado la inhibición de la replicación viral y actividad anti-VIH por parte de las células NK con estas características genotípicas (Alter et al. 2007).

Por otra parte, el genotipo compuesto de KIR2DL1 con HLA-C2 confiere mayor respuesta inhibitoria en infecciones del virus de la hepatitis C (HCV) en comparación con el genotipo KIR2DL3 y HLA-C1 (Ahlenstiel et al. 2008; Winter et al. 1998). Sin embargo, a pesar de una respuesta inhibitoria débil con la combinación de KIR2DL3 y HLA-C1, se ha visto que esta combinación se asocia a una eliminación espontánea del HCV sólo en individuos infectados con un inóculo bajo (Khakoo et al. 2004). Otro estudio menciona que es KIR2DL3 el responsable de esta protección hacia el HCV (Romero et al. 2008). Aunado a esta observación

genética se ha visto una mayor producción de IFN- γ en presencia de la combinación de KIR2DL3 y HLA-C1 en períodos tempranos de la infección por HCV (Ahlenstiel et al. 2008).

El citomegalovirus (CMV) codifica varias proteínas que interfieren con la expresión del MHC de clase I (Lin et al. 2007), mecanismo para evadir la respuesta de las células NK frente a la infección. En algunos casos, la presencia de KIR2DL1 con su ligando HLA-C2 generan una fuerte inhibición en las células NK incapacitándolas para lisar las células infectadas (Gazit et al. 2004). Sin embargo, los receptores KIR activadores han demostrado proteger de la reactivación de CMV durante la depleción de células T después de un trasplante (Cook et al. 2006).

En infecciones por bacterias y por protozoarios como el caso de la tuberculosis y Malaria se han encontrado asociaciones débiles o contradictorias respectivamente. Se ha visto que la frecuencia de KIR2DL3 es más alta en pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (Mendez et al. 2006), mientras que en las infecciones por *P. falciparum* se ha visto un aumento en la producción de IFN- γ en eritrocitos infectados en individuos que poseen el KIR3DL2*002. La respuesta de células NK en infecciones por *P. falciparum* pudiera deberse a la interacción con componentes mieloides del sistema inmune, ya que los eritrocitos no poseen MHC por lo que no es posible un reconocimiento (Artavanis-Tsakonas et al. 2003; Hansen et al. 2007; Roetyneck et al. 2006).

En otras condiciones como son el daño vascular y la inflamación se han demostrado asociaciones con KIRs activadores, en particular con KIR2DS2. Un ejemplo de ello es la Artritis Reumatoide (AR). El aumento de las células CD4⁺CD28^{null} característica de esta enfermedad está asociada a una expresión de KIR2DS2 en ausencia del receptor inhibidor KIR2DL2 (Namekawa et al. 2000). Aunado a esto, la frecuencia de KIR2DS2 es mayor en pacientes con AR que presentan vasculitis que en los que no la presentan y que en controles (Yen et al. 2001). Otras asociaciones KIR/HLA observadas con características clínicas diferentes en individuos con AR, incluyen al genotipo KIR2DL3+/2DS3-, que se encuentra presente en pacientes diagnosticados tempranamente y KIR2DS1 y KIR3DS1 que se encuentran en pacientes con erosión ósea. KIR2DL2/2DS2 se encuentran incrementados en pacientes con manifestaciones extra articulares incluyendo la vasculitis (Majorczyk et al. 2007). KIR2DS2 en ausencia de KIR2DL2 también se ha observado en mayor frecuencia en pacientes con esclerodermia (Momot et al. 2004).

Los haplotipos B (Suzuki et al. 2004), así como el gen KIR2DS1 (Luszczek et al. 2004) se han encontrado asociados a la psoriasis (Holm et al. 2005). En la artritis psoriática se ha propuesto un modelo donde las diferentes combinaciones de KIR2DL1, HLA-C y KIR2DS2 se asocian a un efecto protector, un efecto neutral o un efecto resistente al desarrollo de la

enfermedad. Bajo este modelo Nelson y colaboradores mencionan que el balance de señales de inhibición confiere protección, mientras que el balance de señales activadoras confiere autoinmunidad (Nelson et al. 2004). Estos perfiles activadores en los genes KIR también se han descrito para otras condiciones inflamatorias como son la endometriosis (Kitawaki et al. 2007), la corio-retinopatía de tipo “birdshot” (Levinson et al. 2008), la bronquiectasia idiopática (Boyton et al. 2006), la colangitis esclerosante primaria (Karlsen et al. 2007), y la diabetes de tipo 1 (Middleton et al. 2006; van der Slik et al. 2003).

4. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es miembro de la familia Retroviridae perteneciente al género Lentivirus (Fauquet 2005). Los retrovirus presentan características distintivas del grupo. Dichas características son:

- a) Un genoma compuesto de RNA;
- b) Una estructura viral organizada por tres genes poliprotéicos llamados grupo antígeno específico (*gag*), polimerasa (*pol*) y envoltura (*env*);
- c) Un ciclo de replicación en donde se incorpora la inserción del genoma viral dentro del material genético del hospedero mediante la transcripción inversa, y
- d) La habilidad de alterar su genoma mediante las mutaciones en respuesta a las diferentes presiones de selección.

Los lentivirus, además de los genes estructurales de los retrovirus, se caracterizan por presentar una combinación compleja de genes accesorios o genes no estructurales y de tener largos períodos de latencia clínica durante la infección.

El VIH se caracteriza por una notable diversidad genética que ha derivado en su clasificación en tipos, grupos, subtipos o clados; sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (CRFs) y formas recombinantes únicas (URFs)(Hemelaar et al. 2006; Lal et al. 2005)(Figura 20). El VIH-1, causante de la mayoría de los casos a nivel mundial, puede clasificarse en 4 grupos filogenéticos: M (major), O (outlier), N (non-M, non-O) y P, cada uno correspondiente a un salto interespecie independiente de los virus de inmunodeficiencia del simio (SIV) de chimpancés (para los grupos M y N) y posiblemente de gorilas (para el grupo O y P) en África centro-occidental. El grupo M es el causante del 90% de las infecciones a nivel mundial y es el grupo con mayor diversificación, pudiéndose distinguir diferentes subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J y K) y sub-subtipos (A1-A4, F1-F2) (Frange et al. 2008). África central es la única región en

donde se han identificado todos los grupos del VIH-1 y todos los subtipos del grupo M (Hemelaar et al. 2006).

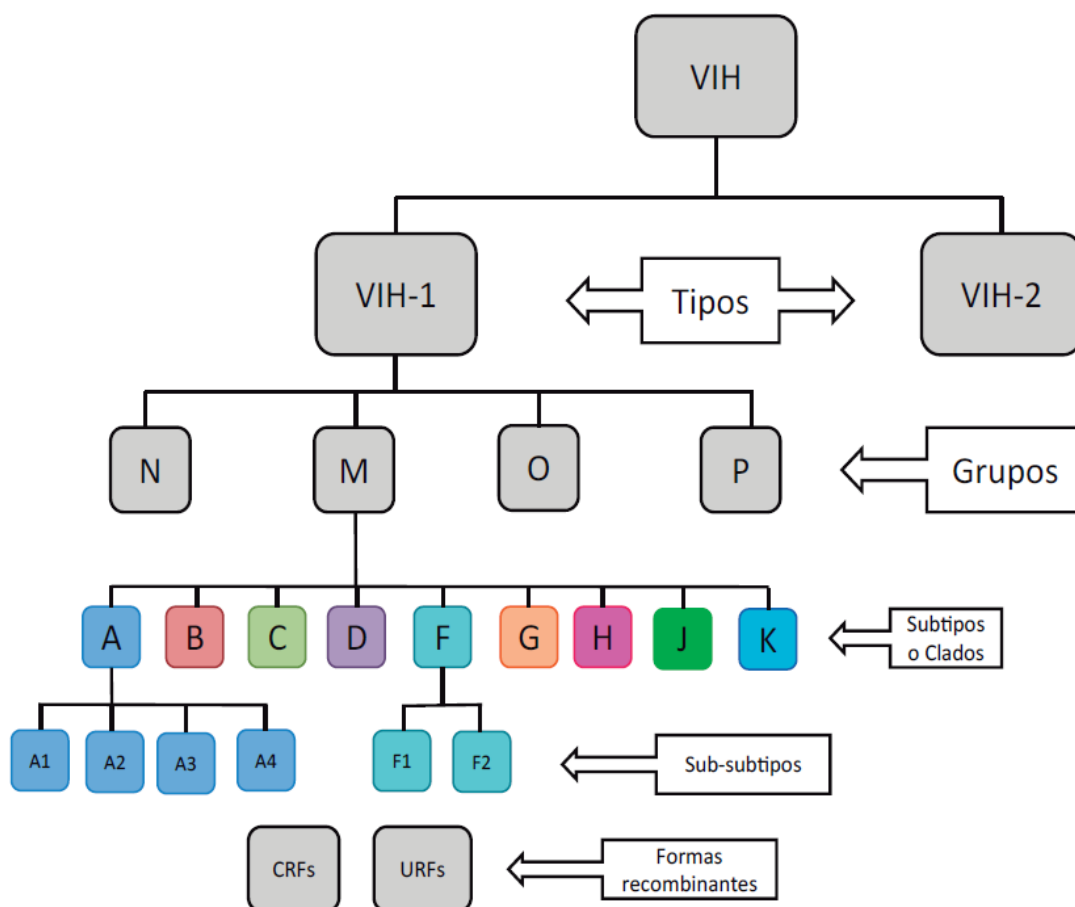


Figura 20. Diversidad del VIH

Se muestra la clasificación del virus en tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos y formas recombinantes. CRFs (Formas recombinantes circulantes) y URFs (Formas recombinantes únicas).

Las formas recombinantes de VIH han surgido por los frecuentes eventos de recombinación de virus de diferentes clados, que han generado virus con regiones genéticas derivadas de dos o más cepas virales. Las llamadas CRFs (CRF01-CRF37) han adquirido la capacidad de propagarse en diversas poblaciones (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html>), las URFs han permanecido como casos aislados. Hasta la fecha, se han identificado formas recombinantes en prácticamente todo el mundo donde circulan dos o más subtipos (Lal et al. 2005). La distribución geográfica mundial de los varios subtipos M del VIH-1 es muy heterogénea, con diferentes subtipos presentes con frecuencias variables en distintos continentes o incluso de país a país (Buonaguro et al. 2007; Hemelaar et al. 2006)(Figura 21).

En Norteamérica predomina el subtipo B, aunque el subtipo C es el más abundante a nivel mundial. Recientemente se ha reportado un incremento constante en la prevalencia de subtipos no-B (2.93% entre 2004 y 2008), especialmente A y C, en Estados Unidos, con una prevalencia relativamente estable de CRFs (Pyne et al. 2013). La información para México, sin embargo, es sumamente escasa y poco representativa, existiendo una gran necesidad de evaluar la Epidemiología Molecular del VIH a nivel nacional (Eyzaguirre et al. 2007; Rivera-Morales et al. 2001).

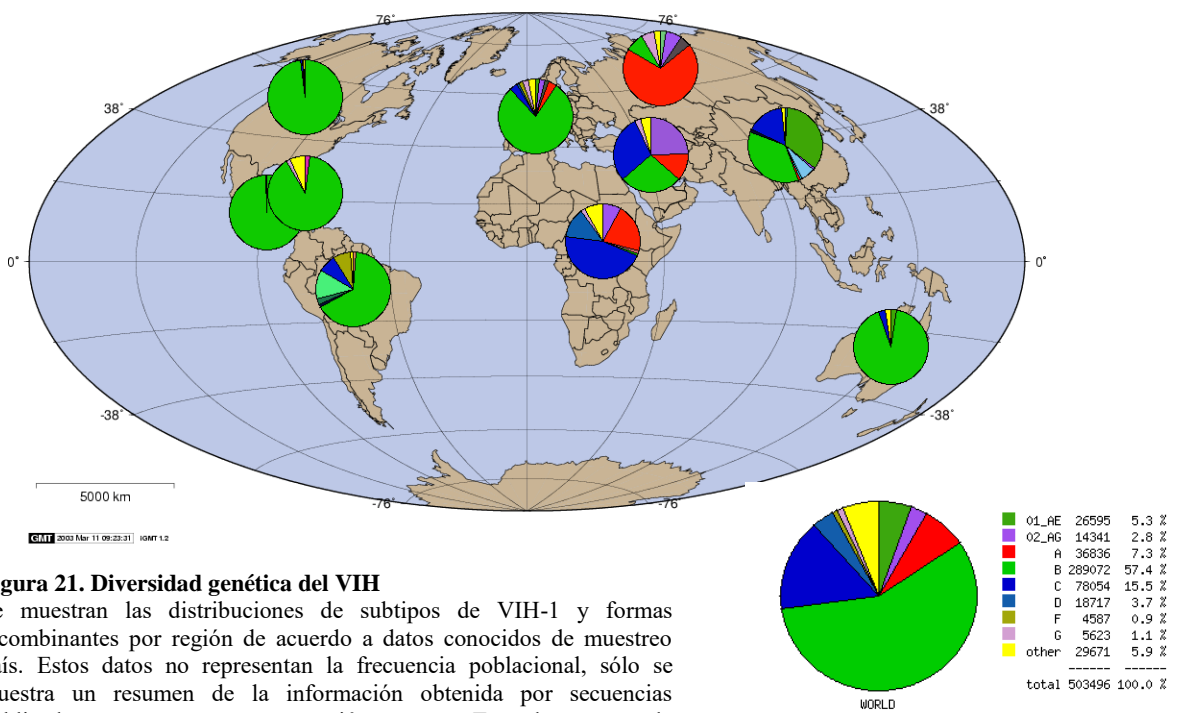


Figura 21. Diversidad genética del VIH

Se muestran las distribuciones de subtipos de VIH-1 y formas recombinantes por región de acuerdo a datos conocidos de muestreo país. Estos datos no representan la frecuencia poblacional, sólo se muestra un resumen de la información obtenida por secuencias publicadas por región. Tomado de <http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp>

La diversidad del VIH tiene implicaciones importantes para múltiples aspectos de la pandemia como son el diagnóstico, pruebas de seguimiento, diseño de vacunas, susceptibilidad a fármacos ARVs, capacidad de transmisión y virulencia de los virus circulantes y progresión de la enfermedad (Geretti 2006; Hemelaar 2013).

4.1 Historia Natural de la Infección por VIH

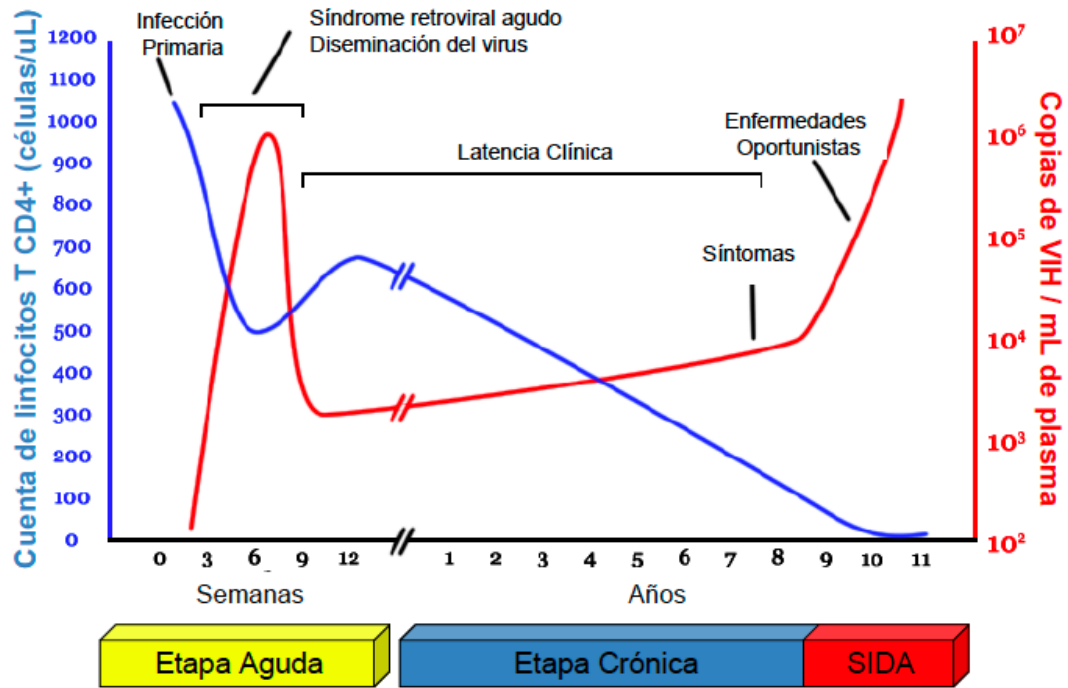


Figura 22. Historia Natural de la infección por VIH

Se muestra la variación típica de dos parámetros clínicos para el seguimiento de la infección: la cuenta de linfocitos T CD4⁺ en sangre y la carga viral del VIH en plasma. Se resaltan la etapa aguda, la etapa crónica y la etapa de SIDA.

La infección típica por VIH se asocia a un decremento progresivo en la cuenta de linfocitos T CD4⁺ en sangre y a un aumento progresivo de la carga viral plasmática. Estos dos marcadores clínicos se han utilizado tradicionalmente para el seguimiento de la infección por el virus. La infección por VIH puede dividirse en tres etapas: la etapa aguda, la etapa crónica asintomática y la fase de SIDA (Figura 22), aunque el curso de la enfermedad es variable de persona a persona. El tiempo de la infección aguda al desarrollo de SIDA, definido por cuentas de linfocitos T CD4⁺ menores a 200 células/ μ l o por la aparición de infecciones oportunistas definitorias de SIDA puede ser variable, en algunas personas es tan rápido como 6 meses (Markowitz et al. 2005), mientras que otras llevan más de 25 años infectadas manteniendo niveles normales de linfocitos T CD4⁺, sin mostrar inmunodeficiencia y sin necesidad de tratamiento antirretroviral (ARV) (Kuritzkes 2007b).

La etapa aguda inicia con la transmisión del virus a través de fluidos corporales de una persona infectada a otra. Esta etapa se caracteriza por una replicación rápida inmediatamente después de la exposición del individuo al VIH, alcanzándose niveles de 10^6 a 10^7 copias de

RNA viral por mL de sangre en el pico de viremia y estabilizándose éstos en un punto de equilibrio promedio (llamado setpoint viral) de alrededor de 30,000 copias/mL dentro de los primeros 6 a 12 meses de la infección (Figura 22).

Sin embargo, este punto de equilibrio es variable y su valor se relaciona con el riesgo de progresión de la enfermedad (valores altos correlacionan con progresión rápida, mientras que valores bajos correlacionan con progresión lenta) (Lu et al. 2004). Durante la infección aguda ocurre una infección del 30 al 60 % de los linfocitos T CD4⁺ del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), resultando en una pérdida masiva e irrecuperable de los linfocitos T CD4⁺ de memoria efectora locales en un período de tan solo 4 días (Grossman et al. 2006; Mattapallil et al. 2005). Durante esta etapa temprana de la enfermedad por VIH, más de la mitad de los linfocitos T CD4⁺ de memoria se pierden, dejando al organismo un repertorio severamente restringido de células T para enfrentar la fase crónica de la infección (Kuritzkes 2007a). De forma importante, el daño en el microambiente epitelial del intestino, con sus funciones antimicrobianas características, resultan en la translocación de productos bacterianos del lumen intestinal a circulación periférica, lo cual correlaciona con el desarrollo de activación generalizada del sistema inmunológico, característico de la fase crónica de la enfermedad (Brenchley et al. 2006).

La etapa aguda de la enfermedad por VIH va acompañada de un 50 al 70% de los casos por síntomas inespecíficos que inician dos semanas después de la exposición y que incluyen frecuentemente fiebre, faringitis, dolor de cabeza, artralgias, mialgias, malestar, pérdida de peso, exantemas maculopapulares no pruríticos y linfadenopatía generalizada (Kuritzkes 2007a). Estos síntomas definitorios del llamado síndrome retroviral agudo se resuelven en 3 a 4 semanas. Una vez resuelta la fase primaria de la infección se establece un estado virológico cuasi-estable que define al periodo crónico de la enfermedad por VIH. Aunque la mayoría de los pacientes permaneces asintomáticos durante este periodo, existe una replicación viral constante que causa una depleción lenta pero continua de linfocitos T CD4⁺ (Figura 22). Las infecciones oportunistas y cánceres son raros en personas infectadas con cuentas de linfocitos T CD4⁺ superiores a 500 células/ μ l, pero su frecuencia aumenta a medida que este valor disminuye. La candidiasis oral, infecciones neumococales, tuberculosis, reactivación de herpes simplex y varicela zoster son comunes. Con cuentas de células T CD4⁺ menores a 200 células/ μ l se incrementa el riesgo de infecciones oportunistas que ponen en riesgo la vida del paciente definiendo la etapa avanzada de la enfermedad o SIDA. Infecciones oportunistas comunes incluyen neumonía por *Pneumocystis jiroveci*, esofagitis por *Candida*, histoplasmosis diseminada, infecciones fúngicas sistémicas, encefalitis por *Toxoplasma* y meningitis criptococal. La presencia de infección por el complejo *Mycobacterium avium* (MAC), reactivación de infección por citomegalovirus (CMV), criptosporidiosis, microsporidiosis y

leucoencefalopatías multifocal por virus JC son indicadores de inmunodeficiencia profunda y se presentan con cuentas de linfocitos T CD4+ menores a 50 células/ μ l.

Los cánceres asociados al SIDA se asocian comúnmente a etiologías virales incluyendo al sarcoma de Kaposi, causado por el herpesvirus humano 8; linfomas asociados con el virus Epstein-Barr y carcinomas anales y cervicales asociados al virus del papiloma humano (Kuritzkes 2007a). El tiempo promedio desde la seroconversión hasta el desarrollo de SIDA en ausencia de tratamiento es de entre 9 y 10 años (aunque este tiempo es ampliamente variable de persona a persona debido a múltiples factores inmunológicos, genéticos y virales), mientras que la expectativa de vida a partir del desarrollo de SIDA es de un poco más de 9 meses (Morgan et al. 2002). Sin embargo, la terapia ARV ha cambiado radicalmente la historia de la infección por VIH.

5. Planteamiento del Problema

La infección por el VIH-1 implica mecanismos complejos entre el virus y los factores genéticos del hospedero. Diversos estudios han revelado que los factores genéticos tienen mayor importancia en la progresión de la enfermedad por el VIH, incluyendo alelos HLA específicos de clase I (Carrington et al. 1999; Carrington and O'Brien 2003; Fellay et al. 2009; Fellay et al. 2007; Flores-Villanueva et al. 2003; Flores-Villanueva et al. 2001; Gao et al. 2001; Itescu et al. 1992; Kaslow et al. 1996; Kaslow et al. 1990; Tang et al. 1999; Thomas et al. 2009), varios receptores de leucocitos (Bashirova et al. 2014; Bisio et al. 2013; Christiansen 2002; Gaudieri et al. 2005; Lichterfeld and Yu 2012), los receptores de quimiocinas (An et al. 2002; Anzala et al. 1998; Dean et al. 1996; Dean et al. 1999; Duggal et al. 2003; Martin et al. 1998; Modi et al. 2003; Smith et al. 1997; Winkler et al. 1998) y algunas proteínas intracelulares (An et al. 2007; An et al. 2009; Chakrabarti and Simon 2010; Refsland et al. 2010; Ross 2009; van Manen et al. 2008). De todos estos factores genéticos, los alelos HLA han mostrado de forma consistente asociaciones con la progresión a la enfermedad (Fellay et al. 2009; Fellay et al. 2007). Su gran variabilidad y frecuencia diferencial entre poblaciones ha marcado el gran interés por estas moléculas en la infección por el VIH. Aunado a esto, se ha demostrado que la progresión a la enfermedad también se ve afectada por la unión específica que los alelos HLA tienen con los receptores KIR de las células NK (Alter et al. 2007; Boulet et al. 2008a; Carrington et al. 2008; Iannello et al. 2008; Khakoo and Carrington 2006; Lopez-Vazquez et al. 2005; Martin et al. 2002; Martin et al. 2007).

Existen ciertas asociaciones KIR-HLA con efecto en la progresión a la infección. Una de las asociaciones más documentada es de los receptores KIR3DS1/L1 en combinación con HLA-Bw4^{8011e}, ésta combinación favorece el reconocimiento de las células infectadas por las células NK lo que conlleva a una progresión más lenta a la enfermedad, así como una disminución en la replicación del VIH, demostrada por una carga viral baja (Cooper et al. 2001b; Martin et al. 2002). Por otro lado, la presencia del receptor KIR2DS2 en combinación con el HLA-C1 se asocia a una disminución de los conteos de linfocitos T CD4⁺ (Gaudieri et al. 2005). Sin embargo, estas asociaciones con la progresión a la enfermedad no han sido consistentes entre diferentes poblaciones o cohortes (Alter et al. 2007; Barbour et al. 2007; Boulet et al. 2008b; Cohen et al. 1999; Gaudieri et al. 2005; Jenness et al. 2006; Jenness et al. ; Long et al. 2008; Martin et al. 2002; Martin et al. 2007; O'Connor et al. 2007). No se ha descrito si estas diferencias observadas entre las poblaciones se deban al polimorfismo conocido de las moléculas HLA y KIR y/o a la distribución diferencial a nivel poblacional de éstas (Gonzalez-Galarza et al. 2011; Goulder and Watkins 2008; Hollenbach et al. 2010; Hollenbach et al. 2012; Middleton et al. 2003; Williams et al. 2001). Adicionalmente, no se conoce el efecto que la estratificación genética intra y entre poblaciones pueda tener en este ámbito.

Los mestizos mexicanos, como otras poblaciones Latinas, se han mezclado recientemente y muestran características derivadas de los Nativos Americanos, de los colonizadores Europeos (principalmente de España) y en menor grado de los Africanos (Beltrán 1989; Stavenhagen 1997). Con este enfoque, las poblaciones mestizas proveen una oportunidad de estudiar los efectos de la estratificación genética en la infección por el VIH-1 en una sola población, así como la posibilidad de identificar nuevas interacciones KIR/HLA que tengan un impacto en el control del VIH. Nuestros datos sugieren que los antecedentes genéticos pueden evidenciar las diferencias observadas en la progresión de la enfermedad del VIH a nivel poblacional. Este hecho destaca la importancia de expandir nuestros estudios hacia las diferencias intra e inter poblaciones para el mejor entendimiento de los factores genéticos que pueden estar asociados a la enfermedad.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Caracterizar las interacciones KIR-HLA que puedan tener un impacto en la progresión a la infección por VIH, haciendo uso de la genotipificación ancestral para determinar si las características intrínsecas de la población mexicana afectan estas interacciones.

6.2 Objetivos Particulares

- Describir las frecuencias de los genes KIR en una cohorte de individuos mexicanos VIH positivos.
- Determinar los haplotipos KIR presentes en la cohorte de individuos mexicanos VIH positivos.
- Describir las frecuencias de los motivos serológicos HLA de clase I en la misma cohorte de individuos mexicanos VIH positivos.
- Determinar la genotipificación ancestral de la cohorte de individuos mexicanos VIH positivos haciendo uso de un panel de SNPs conocidos para las poblaciones latinoamericanas.
- Buscar las asociaciones KIR-HLA previamente descritas como protectoras o de riesgo para el control de la infección por VIH en la cohorte en estudio.
- Buscar nuevas asociaciones KIR-HLA en el contexto inmunogenético de la población mexicana.
- Determinar el efecto que la estratificación genética de la población mestiza mexicana pueda tener en la infección por VIH.

7. Hipótesis

El contexto inmunogenético único de la población mexicana permitirá la identificación de nuevas asociaciones KIR-HLA que puedan tener un impacto en el control de la infección por VIH. Así mismo, las características intrínsecas de la población mexicana permitirán evaluar el impacto que la estratificación genética puede tener en una enfermedad crónica como el VIH/SIDA siendo ésta diferente para individuos con características más Amerindias que Caucásicas y viceversa.

8. Métodos

8.1 Declaración Ética

El presente estudio fue aprobado por el comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Cada participante firmó una carta consentimiento antes de obtener la donación de muestras de sangre. Este estudio se llevó a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki.

8.2 Individuos

Se obtuvo sangre periférica de 511 individuos infectados por el VIH vírgenes al tratamiento, de diferentes centros de salud en Jalisco, Michoacán, Baja California, Sonora, Sinaloa, Tamaulipas y Nuevo León de la región del norte del país; así como de la Ciudad de México, Hidalgo, Puebla, Estado de México, Veracruz, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Quintana Roo y Yucatán de la región centro-sur del país (Figura 23). Todas las muestras de sangre se enviaron y procesaron en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER en la ciudad de México.

8.3 Extracción de ADN; determinación de la presencia o ausencia de los genes KIR y genotipificación de los genes HLA de clase I

Se separaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por gradiente de densidad (Ficoll-Paque; Pharmacia, Uppsala, Sweden) y se criopreservaron en 90% de suero bovino fetal (FCS; Canadian Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) con 10% de sulfoxido dimetilo (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Se extrajo DNA genómico a partir de 6 millones de CMSP usando el paquete comercial QIAamp DNA blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La presencia o ausencia de 16 genes KIR se determinó a partir del DNA genómico empleando el estuche comercial KIR Genotyping SSP kit (Invitrogen, Brown Deer, WI) que se basa en una PCR de secuencia específica (PCR-SSP) para cada gen. La presencia o ausencia de cada gen se determinó mediante la hoja de trabajo proporcionada por el fabricante. Aquellas pruebas donde no hubo amplificación o faltaron las bandas de control se repitieron.

La genotipificación en alta resolución de los genes de clase I HLA-A, -B y -C se realizó mediante secuenciación de Sanger, empleando los estuches comerciales SeCore Express A, B y

Cw locus (Invitrogen, Brown Deer, WI). La asignación de alelos se realizó mediante el programa uTYPE v6.0 (Invitrogen). Las ambigüedades se resolvieron por frecuencia usando la herramienta HLA Completion, disponible en línea (Listgarten et al. 2008).

Los grupos Bw4 o Bw6 de HLA se definieron de acuerdo a los residuos observados en las posiciones 77-80. El grupo Bw4 se subdividió de acuerdo a la presencia de una treonina (T) o de una isoleucina (I) en la posición 80; Bw6 por la presencia de asparagina (N) en esta misma posición. HLA-C1 se definió por la presencia de una serina (S) en la posición 77 y una asparagina (N) en la posición 80, mientras que HLA-C2 se definió por la presencia de una asparagina (N) en la posición 77 y una lisina (K) en la posición 80.

8.4 Determinación del setpoint viral del VIH y conteo de linfocitos T CD4⁺

La carga viral del VIH se determinó por una PCR en tiempo real automatizada usando el sistema m2000 (Abbott, Abbott Park, IL). El conteo de linfocitos T CD4⁺ se determinó por Citometría de Flujo usando el paquete comercial Trucount en un FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA).

El setpoint viral del VIH es el punto de inflexión donde la replicación del VIH se ve aparentemente controlada por el sistema inmune previo a la entrada de la etapa crónica de la infección. Este setpoint se determinó en cada participante usando una media móvil de cada carga viral con una ventana de dos meses y un promedio de seguimiento por individuo de 18 meses (12-36 meses).

8.5 Designación de haplotipos y genotipos KIR

El porcentaje de individuos que posee cada gen KIR se determinó por conteo directo. Los haplotipos A o B se determinaron basados en el contenido genético presente. Los genotipos que incluyen los genes KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DP1, KIR3DP1, KIR2DL4, KIR3DL1 y KIR2DS4 se clasificaron como homocigotos para el haplotipo A y se les designó el genotipo AA. Las muestras que no presentaran alguno de los 4 genes asociados al haplotipo A (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1 y KIR2DS4) se les asignó el haplotipo B y se les consideró el genotipo Bx. No se hicieron distinciones entre los haplotipos AB y BB. Los cuatro genes constitutivos (KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DP1 y KIR2DL4) se encontraron en todos los sujetos del estudio. Las frecuencias de los haplotipos AA y Bx se calcularon por conteo directo considerando la presencia o ausencia de los genes KIR asociados a los haplotipos A y B como se describió anteriormente.

Los genotipos Bx se dividieron en grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de los grupos de genes centroméricos y teloméricos. El grupo de genes centroméricos (C4) incluye a los genes KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS3 y KIR2DL5; mientras que el grupo de genes teloméricos (T4) incluye a los genes KIR3DS1, KIR2DL5, KIR2DS1 y KIR2DS5 (Du et al. 2008). Con base en la presencia o ausencia de los grupos C4 y T4, se definieron los siguientes cuatro sub-grupos: C4Tx (presencia de C4 y ausencia de T4), CxT4 (ausencia de C4 y presencia de T4), C4T4 (presencia tanto de C4 como de T4) y CxTx (ausencia de ambos grupos C4 y T4).

8.6 Tipificación componentes ancestrales

Para determinar los componentes ancestrales se usaron 128 marcadores informativos de ancestría (AIM), seleccionados de un panel previamente reportado como informativo para las poblaciones Latinoamericanas (Pereyra et al. 2010) (Anexo 1). La tipificación se llevó a cabo usando la tecnología OpenArray en un QuantStudio 12k Flex System (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Brevemente, las muestras de DNA genómico se normalizaron a 50 ng/μl y 2.5 μl de éste DNA se mezcló con 2.5 μl del TaqMan OpenArray Genotyping Master Mix (Life Technologies) en una placa de 384 pozos. Las mezclas se cargaron en las placas OpenArray precargadas con las pruebas e iniciadores necesarios, usando el sistema AccuFill (Life Technologies). La amplificación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron usando el programa TaqMan Genotyper v1.2. Se llevó a cabo una prueba de calidad en los datos usando el programa Plink (Purcell et al. 2007). Se excluyeron a aquellos individuos que presentaran 10% o más de alelos faltantes.

8.7 Análisis de componentes ancestrales

Se usaron dos métodos para reportar las proporciones ancestrales de la cohorte mexicana en estudio. Primero, se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) usando las tres poblaciones ancestrales relevantes para los mestizos mexicanos: Europea, Africana y Amerindia. Los genotipos para Africanos y Europeos se obtuvieron en línea del HapMap Phase II+III (Frazer et al. 2007; Tiemessen et al. 2011), incluyendo a los Yorubas de Ibadan, Nigeria (YRI) considerados a partir de ahora como AFR y los Europeos del Norte (CEU) denominados a partir de ahora como EUR. Los genotipos del grupo Amerindio (Zapoteco) (llamados a partir de ahora AMI) se obtuvieron del Proyecto de Diversidad Genómica Mexicana (MGDP) (Pereyra et al. 2010). Para poder determinar las distancias genéticas entre los individuos VIH positivos y las poblaciones ancestrales, se realizó un análisis F_{st} pareado. Segundo, para determinar la

ancestría genética y para explicar las tres subestructuras principales en la cohorte de individuos VIH-positivos mexicanos, se calculó el promedio de las proporciones ancestrales usando el programa STRUCTURE (Falush et al. 2003; Falush et al. 2007; Hubisz et al. 2009; Pritchard et al. 2000), usando los 128 AIMs seleccionados anteriormente, y con los datos del HapMap y del grupo Amerindio.

8.8 Análisis estadístico

8.8.1 Comparación de frecuencias KIR y HLA

Históricamente, los individuos mestizos mexicanos con un mayor componente genético europeo se encuentran localizados en la región norte del país, mientras que individuos con un mayor componente genético amerindio se encuentran localizados principalmente en la región sur del país (Barquera et al. 2008; Pereyra et al. 2010). Considerando esto, buscamos posibles diferencias en las distribuciones de genes KIR y alelos HLA en individuos del norte y centro-sur del país (Figura 23), así como entre individuos con mayor (>50%) proporción genética ancestral Europea (EUR) o Amerindia (AMI). Las diferencias en frecuencias entre las regiones del norte y centro-sur, o entre mayor proporción genética ancestral EUR y AMI se estimaron usando la prueba exacta de Fisher. Se estimó el FDR (False Discovery Rate) por múltiples comparaciones mediante la q de Storey (Storey 2002) usando el paquete q -value Bioconductor en R. El nivel de significancia se determinó cuando el valor p es menor a 0.05 y el valor q es menor a 0.2. Todas las comparaciones de frecuencias se llevaron a cabo usando el paquete estadístico de STATA/SE versión 12 (StataCorp, College Station, TX).

8.8.2 Evaluación de la presencia de estructura de base de la población de estudio

La estratificación es un problema común en los estudios poblacionales y más cuando la muestra contiene subpoblaciones subyacentes no conocidas. Esto puede provocar la aparición de asociaciones espurias observadas en algún marcador genético que posea una diferencia en frecuencia dentro de los subgrupos (no conocidos). La estratificación muchas veces resulta en el descubrimiento de falsos positivos. En este estudio, los individuos reclutados provienen de clínicas especializadas para la atención de personas infectadas por el VIH de diferentes estados de la República que colaboran con el CIENI, INER. No contamos con los medios que garantizaran que no hubiera un sesgo genético o estratificación dentro de nuestra cohorte. Para atacar este problema se aplicaron análisis de múltiples correspondencias (MCA) en todas las

variables genéticas independientes (SNPs, alelos HLA y genes KIR) lo que nos permitió determinar la presencia o no de alguna estructura de base en la población a estudiar. Todos los análisis se llevaron a cabo usando el paquete estadístico R.

8.8.3 Estrategia de reducción de variables

Debido al gran número de variables genéticas independientes a analizar y debido a que todas esas variables podrían correlacionar entre sí, se implementó una estrategia de reducción de variables basada en el método descrito anteriormente por Karim y colaboradores (Karim et al. 2013).

Para ello, primero se retiró la redundancia de los SNPs quedándonos sólo con los homocigotos1 como una variable dicotómica. Esto nos ayuda a capturar la varianza de los datos de mejor forma que considerando los tres estados de los SNPs (hom1 heter hom2). Aunado a esto, no se pierde información relevante ya que el ser homocigoto1 implica el no ser heterocigoto u homocigoto2 y al revés. Posteriormente se calcularon los ejes de variación genética mediante el uso del análisis de componentes principales (PCA) que nos permite identificar a los individuos que posean la combinación de variables que mejor capture la varianza de los datos (aquellos individuos que contribuyen más a cada componente). Una vez detectados esos individuos cardinales, se les consideró como los centros para poder llevar a cabo el algoritmo de agrupamiento de k-means en los datos. A partir de esto, se dedujeron las variables que normalmente co-ocurren en los individuos y aquellas que no lo hacen. Para poder establecer la confianza en nuestro método, se aplicó el algoritmo de partición en donde las variables se fueron reemplazando para volver a generar los grupos haciendo un bootstrap de 1000 repeticiones.

Aquellas variables que compartieron un grupo en al menos 70% de las réplicas se colapsaron en una variable compuesta (cluster). Éste umbral se decidió de acuerdo a los resultados obtenidos al usar esta estrategia en bases de datos aleatorias.

Todas las variables genéticas a utilizar en el estudio y que fueron sometidas a esta estrategia se codificaron de forma dicotómica.

8.8.4 Análisis multivariado

Previo al análisis multivariado se llevó a cabo un análisis univariado con cada una de las variables clínicas siguientes: el conteo de linfocitos T CD4⁺ (células/ μ l), el conteo de linfocitos T CD8⁺ (células/ μ l), la razón linfocitos T CD4⁺: T CD8⁺, el setpoint de la carga viral (CV) en plasma (log10 RNA copias/ml) y el Z-score que fue creado como una variable de aproximación a la progresión de la enfermedad para cada individuo y que se define como:

$$Z - score = \left(\frac{CD4 - meanCD4}{sdCD4} \right) - \left(\frac{CV - meanCV}{sdCV} \right) / 2$$

Un Z-score alto se asocia a individuos que presentan altos conteos de linfocitos T CD4+ y bajos niveles de Carga Viral; mientras que un Z-score bajo representa lo opuesto.

Las variables genéticas independientes (incluyendo las variables compuestas) fueron: ancestría (obtenidas de los 128 SNPs tipificados), región de origen (norte y centro-sur), alelos HLA, motivos serológicos HLA (Bw4, Bw6, C1 y C2), genes KIR (excluyendo genes constitutivos) y los haplotipos KIR (AA, Bx). También se incluyeron las combinaciones de los genes KIR con las moléculas HLA. Todas las combinaciones posibles entre los genes KIR2D y las moléculas HLA-C así como los genes KIR3D con las moléculas HLA-B se estudiaron. De esta forma se consideraron todos los pares KIR-HLA previamente identificados y posibles nuevas interacciones KIR-HLA que hasta el momento no se han descrito (Lanier 1998). Los análisis se llevaron a cabo en variables con al menos una frecuencia de 12 individuos en cada grupo categorizado como 0 y 1 (todas las variables fueron dicotómicas); este requisito nos permitió detectar los efectos con confianza y se determinó a través del cálculo de potencia teniendo en cuenta el tamaño de la muestra.

Los análisis multivariados consistieron en análisis de regresión logística multivariada para cada variable independiente considerando el género y la edad como variables confusoras; en cada regresión individual se usaron como variables confusoras todas aquellas variables genéticas que resultaron significativas ($p < 0.05$) en el análisis univariado para cada una de las variables clínicas dependientes estudiadas. Todos los análisis se llevaron a cabo usando el paquete estadístico R.

9. Resultados

9.1 Descripción de la Cohorte

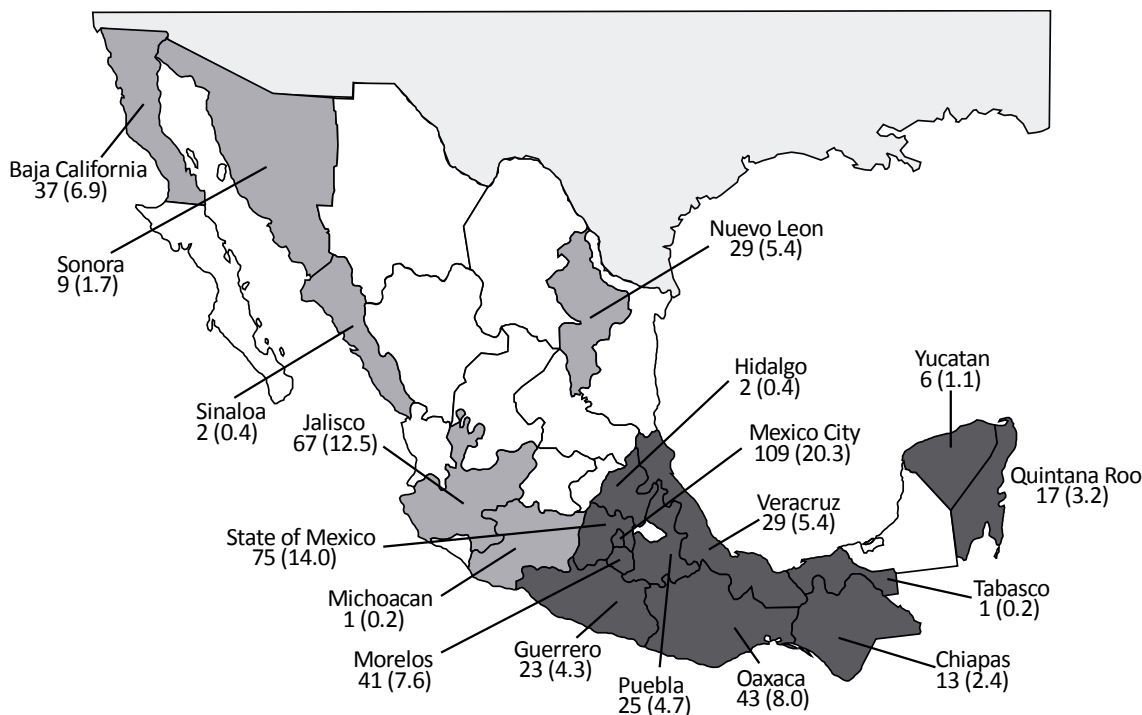


Figura 23. Distribución geográfica de la cohorte

El mapa muestra datos de 511 individuos VIH positivos, sin tratamiento ARV previo. Los estados en gris claro representan individuos de la región norte del país. Los estados en gris oscuro representan individuos de la región centro-sur del país. El número de individuos y su proporción correspondiente en el estudio [n(%)] se muestra para cada estado. No había datos disponibles para 6 individuos.

Para el presente estudio se reunió de manera prospectiva una cohorte de 511 individuos VIH positivos subtipo B, sin tratamiento ARV previo y en la fase crónica temprana de la enfermedad. La media de conteo de linfocitos T CD4+ fue de 551 células/ μ l (Rango Intercuartil (IQR) 441-686 células/ μ l) y la media de setpoint de CV de 4.4 log copias RNA/ml (IQR: 3.8-4.8 log copias RNA/ml) (Tabla 2).

Los individuos reclutados para este estudio provienen de clínicas especializadas en VIH de 18 estados de regiones del norte y centro-sur de la República Mexicana (Figura 23) que en conjunto contribuyen aproximadamente al 80% del total de infecciones de VIH reportadas para el país (CENSIDA 2014). La mayoría de los participantes (73%) provienen de los estados de la región centro-sur del país, mientras que el 27% proviene de los estados de la región norte del país (Figura 23). La razón hombre:mujer fue de 3:1, siendo este dato semejante al reportado previamente para la población mexicana (CENSIDA 2014; UNAIDS 2012; WHO).

Tabla 2. Datos clínicos y demográficos de la cohorte en estudio

| | Todos | Norte ^a | Centro-Sur ^a | EUR 50% ^d | AMI 50% ^d |
|---------------------------|-------|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Datos Demográficos | | | | | |
| Individuos reclutados | 511 | 137 (27.1) | 368 (72.9) | 110 (26.8) | 300 (73.2) |

| | | | | | |
|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Mujeres [n (%)] ^b | 102 (20.0) | 31 (22.8) | 68 (18.5) | 20 (18.3) | 61 (20.3) |
| Valor p | | | 0.312 | | 0.779 |
| Edad [años; mediana (IQR)] ^c | 28 (23–36) | 33 (26–38) | 27 (23–34) | 32 (26–39) | 27 (22–34) |
| Valor p | | | <0.0001 | | <0.0001 |
| Datos Clínicos | | | | | |
| Setpoint viral en plasma [log RNA copias/μl; mediana (IQR)] | 4.4 (3.8–4.8) | 4.3 (3.8–4.6) | 4.4 (3.8–4.8) | 4.4 (3.8–4.8) | 4.4 (3.8–4.8) |
| Valor p | | | 0.108 | | 0.799 |
| Conteo de linfocitos T CD4 ⁺ [células/ml; mediana (IQR)] | 551 (441–686) | 550 (449–677) | 553 (439–697) | 598 (460–740) | 534 (435–651) |
| Valor p | | | 0.783 | | 0.0260 |

Las diferencias entre grupos se estimaron usando la prueba exacta de Fisher, Mann-Whitney o Regresión Lineal de acuerdo al tipo de variable. Se considera estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$

^aNo se tienen datos para seis individuos

^bNo se tienen datos para un individuo

^cNo se tienen datos para 16 individuos

^dEl número total de individuos con determinación de proporciones genéticas ancestrales fue de 410.

Se logró la tipificación ancestral completa de 410 individuos (80%) usando un panel de 128 AIMs que nos permiten discriminar entre las 3 poblaciones ancestrales: amerindio (AMI), europeo (EUR) y africano (AFR) (Moreno-Estrada et al. 2014; Silva-Zolezzi et al. 2009) (Anexo 1). En el análisis de componentes principales (PCA) es posible observar que el componente AFR fue el más distante de los individuos VIH positivos mexicanos y que éstos están más relacionados con las poblaciones de referencia EUR y AMI como se esperaba (Figura 24, A y C). Para confirmar las características genéticas ancestrales de la cohorte en estudio, se realizó un análisis de F_{st} para poder medir las distancias genéticas entre nuestra población de estudio y las poblaciones ancestrales de referencia. Los individuos VIH positivos mostraron los valores más bajos de F_{st} con relación a la población AMI (2.08), seguida por la población ancestral EUR (2.72). Los valores más altos se observaron entre las poblaciones de referencia AFR y AMI (7.32), seguido de la población EUR versus AMI (6.43) (Tabla 3). Estos resultados de F_{st} son consistentes con los resultados obtenidos del PCA. Adicionalmente, las medias de ancestría fueron 0.416 EUR, 0.026 AFR y 0.557 AMI para la cohorte mexicana infectada por el VIH en general (Tabla 4). Por lo tanto, de acuerdo a este modelo y de forma consistente con los análisis de PCA (FIG) y F_{st} , (Tabla 3) la mayor contribución ancestral observada en nuestra población de estudio proviene de la población ancestral AMI.

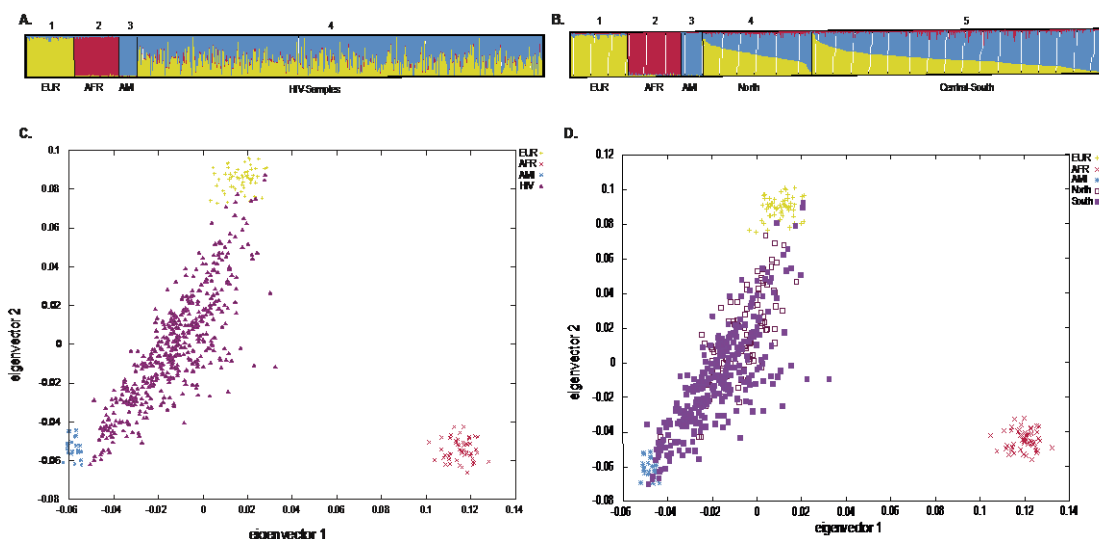


Figura 24. Proporción de componentes ancestrales

Se determinó mediante un análisis de componentes principales (PCA) la proporción de componentes ancestrales para 410 individuos infectados por el VIH usando 128 AIMs reportados previamente como informativos para las poblaciones Latinoamericanas (Ruiz-Linares et al. 2014). A. El mestizaje se determinó mediante el método usado por Pritchard et al., e implementado en el software STRUCTURE (Pritchard et al. 2000); cada barra vertical representa a un individuo y su proporción de mestizaje basado en las poblaciones parentales mostradas a la izquierda. B. Se muestra la proporción de mestizaje de los individuos infectados por el VIH ordenados por región geográfica. C. Se muestra el análisis de los dos primeros componentes incluyendo las tres poblaciones ancestrales y todos los individuos infectados por el VIH. Las poblaciones están identificadas por el color y la figura mostrada en la leyenda. D. Análisis de los dos primeros componentes incluyendo las tres poblaciones ancestrales y todos los individuos infectados por el VIH ordenados por región geográfica. Las poblaciones y regiones están identificadas de acuerdo a la leyenda.

Tabla 3. Análisis F_{st}

| | AFR | AMI | Norte | Centro-Sur | VIH |
|-------|------|------|-------|------------|------|
| EUR | 6.20 | 6.43 | 1.96 | 3.03 | 2.72 |
| AFR | | 7.32 | 4.67 | 5.00 | 4.88 |
| AMI | | | 2.80 | 1.83 | 2.08 |
| Norte | | | | 0.21 | |

Se muestran los datos obtenidos por el análisis F_{st} ($X1000$) entre los individuos infectados por el VIH y las tres poblaciones de referencia

Para determinar si la región del Norte y Centro-Sur del país están caracterizados por diferentes antecedentes genéticos, comparamos las proporciones ancestrales individuales entre los individuos con mayor componente ancestral AMI o EUR en cada región geográfica. Observamos una mayor proporción de individuos con mayor componente ancestral AMI que individuos con mayor componente ancestral EUR en la región Centro-Sur ($p < 0.0001$), como se esperaba. No se encontraron diferencias entre los individuos de la región Norte del país. Los análisis de PCS y F_{st} confirman estos resultados, con un mayor promedio de distancia genética observada entre los individuos de la región Centro-Sur y la población de referencia ancestral EUR (3.03) comparado con individuos de la región Norte (1.96, $p < 0.00001$) (Figura 24, B y D) (Tabla 3).

Tabla 4. Promedio de proporciones ancestrales

| STRUCTURE, unsupervised clustering, K=3 | | | |
|---|-------|-------|-------|
| Population | EUR | AFR | AMI |
| EUR | 0.957 | 0.003 | 0.039 |
| AFR | 0.018 | 0.961 | 0.021 |
| AMI | 0.010 | 0.001 | 0.989 |
| North | 0.492 | 0.025 | 0.483 |
| South | 0.340 | 0.027 | 0.632 |
| HIV | 0.416 | 0.026 | 0.557 |

Se muestra el promedio de proporciones ancestrales entre los individuos infectados por el VIH y las poblaciones ancestrales de referencia africana (AFR), europea (EUR) y amerindia (AMI). Las proporciones ancestrales se calcularon usando los 128 AIMs usando el software STRUCTURE, ajustando los parámetros a K=3

9.2 Perfil genético KIR

9.2.1 Frecuencia genética KIR

Parte de la descripción inmunogenética de la cohorte consistió en la determinación de la frecuencia genética y haplotípica de los receptores KIR.

Se obtuvo la tipificación de 511 individuos participantes en este estudio. Los cuatro genes constitutivos (KIR2DL4, -3DL2, -3DL3 y -3DP1) se encontraron en el 100% de los participantes. Los genes KIR2DL1 y KIR3DL1 fueron los más frecuentes en la población (98% y 96%, respectivamente) mientras que el gen KIR2DS3 fue el menos frecuente (16%) (Tabla 5).

La mayoría de los genes KIR mostraron frecuencias similares entre las regiones del Norte y Centro-Sur así como entre individuos con mayor componente ancestral EUR y AMI (Tabla 5). Sin embargo, se observaron algunas diferencias entre los genes KIR asociados al haplotipo B entre la región del Norte y Centro-Sur. KIR3DS1 ($p=0.005$, $q=0.11$), KIR2DS1 ($p=0.011$, $q=0.11$), KIR2DS5 ($p=0.014$, $q=0.11$) y KIR2DL5 ($p=0.025$, $q=0.12$) se encontraron en mayor frecuencia en individuos de la región Norte (Tabla 5). Considerando las proporciones ancestrales, KIR2DL3 se encontró más frecuente en individuos con mayor componente ancestral AMI ($p=0.015$, $q=0.12$) (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de genes KIR en individuos infectados por el VIH

| | Genes KIR asociados al haplotipo A | | | | Genes KIR asociados al haplotipo B | | | | | | | Genes constitutivos y Pseudogenes | | | | |
|------------------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|-----------------------------------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| | 2DL1 | 2DL3 | 3DL1 | 2DS4 | 2DL2 | 2DL5 | 3DS1 | 2DS1 | 2DS2 | 2DS3 | 2DS5 | 2DL4 | 3DL2 | 3DL3 | 2DP1 | 3DP1 |
| | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) |
| Todos (n=511) | 98.0 (501) | 93.9 (408) | 96.1 (491) | 91.6 (468) | 45.4 (232) | 50.9 (260) | 43.1 (220) | 42.7 (218) | 44.6 (228) | 16.6 (85) | 40.7 (208) | 100.0 (511) | 100.0 (511) | 100.0 (511) | 96.1 (491) | 100.0 (511) |
| Norte (n=137) | 98.5 (135) | 91.0 (124) | 96.4 (132) | 91.2 (125) | 45.3 (62) | 60.6 (83) | 53.3 (73) | 51.8 (71) | 45.3 (62) | 16.1 (22) | 49.6 (68) | 100.0 (137) | 100.0 (137) | 100.0 (137) | 94.9 (130) | 100.0 (137) |
| Centro-Sur (n=368) | 97.8 (360) | 95.3 (350) | 95.9 (353) | 91.6 (337) | 45.9 (169) | 47.3 (174) | 39.1 (144) | 39.1 (144) | 44.8 (165) | 17.1 (63) | 37.2 (137) | 100.0 (368) | 100.0 (368) | 100.0 (368) | 96.7 (356) | 100.0 (368) |
| Valor p | | | | | | 0.025 | 0.005 | 0.011 | | | 0.014 | | | | | |
| Valor q | | | | | | 0.12 | 0.11 | 0.11 | | | 0.11 | | | | | |
| EUR >50% (n=110) | 98.1 (108) | 89.1 (98) | 95.5 (105) | 90.0 (99) | 41.8 (46) | 52.7 (58) | 46.4 (51) | 45.5 (50) | 43.6 (48) | 13.6 (15) | 42.7 (47) | 100.0 (110) | 100.0 (110) | 100.0 (110) | 95.5 (105) | 100.0 (110) |
| AMI >50% (n=300) | 98.0 (294) | 96.0 (288) | 96.0 (288) | 94.7 (284) | 43.3 (130) | 48.7 (146) | 41.3 (124) | 41.0 (123) | 42.0 (126) | 14.0 (42) | 39.3 (118) | 100.0 (300) | 100.0 (300) | 100.0 (300) | 96.3 (289) | 100.0 (300) |
| Valor p | | 0.015 | | | | | | | | | | | | | | |
| Valor q | | 0.12 | | | | | | | | | | | | | | |

Se muestra la frecuencia (%F) de cada gen expresada en porcentaje y definida como el número de individuos que poseen el gen (N) dividido por el número de individuos correspondiente a cada sub-grupo de la población (n). Se muestran sólo las comparaciones significativas (p<0.05, q<0.2).

9.2.2 Perfiles genotípicos y haplotípicos KIR

Se observaron un total de 65 genotipos con diferentes combinaciones de los 16 genes KIR. De estos genotipos, 54 corresponden a genotipos previamente descritos mientras que 11 representan nuevos genotipos (Figura 25). Treinta y cinco genotipos se observaron en más de un individuo (95% de la población de estudio), mientras que 30 genotipos fueron representados por una única observación (5% de la población de estudio). De los 11 genotipos nuevos descritos en este trabajo (CIENI01-CIENI11), 8 se observaron en un solo individuo (CIENI05-CIENI11), mientras que CIENI01 y CIENI02 se encontraron en tres individuos cada uno y CIENI03 en dos individuos.

Considerando el número total de genotipos KIR, 62 (95%) se determinaron como haplotipos Bx y 3 (5%) se determinaron como haplotipos AA (Figura 25). Todos los nuevos genotipos se determinaron como genotipos Bx (Figura 25). El genotipo más frecuente observado en el estudio fue el genotipo 1 (AA) seguido por el genotipo 2 (Bx) y el genotipo 4 (Bx) (33%, 12% y 11%, respectivamente).

Realizamos una clasificación más profunda de los haplotipos Bx dividiéndolos en cuatro grupos dependiendo de la presencia o ausencia de los grupos de genes centroméricos (C4) y teloméricos (T4), descrito por el grupo de Du et al 2008. Los cuatro grupos de los genotipos Bx (CxT4, C4Tx, CxTx y C4T4) estuvieron presentes en la cohorte de estudio. Los individuos que presentaban el genotipo CxT4 mostraban de tres a seis genes KIR activadores (27% presentaron 4 genes activadores KIR), mientras que los individuos que presentaban el genotipo C4Tx mostraban de tres a cinco genes KIR activadores (6% presentaron 3 genes activadores); individuos con el genotipo C4T4 presentaban 5 ó 6 genes KIR activadores (4% presentaron cinco genes activadores KIR) y los individuos con el genotipo CxTx presentaban de uno a cinco genes KIR activadores (21% presentaron 2 genes activadores). De los nuevos haplotipos descritos en esta cohorte, tres genotipos incluían genes del grupo telomérico (CIENI02, CIENI04 Y CIENI10) y un genotipo presentaba genes del grupo centromérico (CIENI11) (Figura 25).

| Genotype | Group A haplotype associated genes | Group B haplotype associated genes | Framework/Pseudogenes | Gp Frequency | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|------------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | | | | All (n=511) % (N) | North (n=137) % (N) | South (n=368) % (N) | EUR 50% (n=110) % (N) | AMI 50% (n=300) % (N) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Number | Haplotype | Bx subset | 2DL1 | 2DL3 | 3DL1 | 2DS4 | 2DS2 | 2DL2 | 2DS3 | 2DL5 | 3DS1 | 2DS5 | 2DS1 | 2DPI | 3DPI | 2DL4 | 3DL2 | 3DL3 | | | | | | |
| 1 | AA | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | 32.9 (168) | 26.3 (36) | 35.1 (129) | 27.3 (30) | 36 (108) |
| 4 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12.1 (62) | 8.8 (12) | 13.6 (50) | 14.5 (16) | 11.6 (35) |
| 2 | AB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 11.9 (61) | 13.9 (19) | 10.9 (40) | 14.5 (16) | 13.3 (40) |
| 3 | AB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 8.0 (41) | 10.9 (15) | 7.1 (26) | 5.5 (6) | 9.3 (28) |
| 5 | AB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3.9 (20) | 3.6 (5) | 4.1 (15) | 5.5 (6) | 3.0 (9) |
| 7 | AB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2.0 (10) | 1.5 (2) | 2.2 (8) | 2.7 (3) | 1.3 (4) |
| 93 | BB | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2.0 (10) | 1.5 (2) | 2.2 (8) | 1.8 (2) | 0.3 (1) |
| 80 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.6 (8) | 1.5 (2) | 1.6 (6) | 0.9 (1) | 1.6 (5) |
| 154 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.6 (8) | 0.7 (1) | 1.9 (7) | 2.7 (3) | 1.3 (4) |
| 180 | AA | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.6 (8) | 2.9 (4) | 1.1 (4) | 2.7 (3) | 0.6 (2) |
| 6 | AB | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.4 (7) | 0.7 (1) | 1.6 (6) | 0.0 (0) | 1.3 (4) |
| 8 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.4 (7) | 1.5 (2) | 1.4 (5) | 0.0 (0) | 1.6 (5) |
| 79 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.4 (7) | 2.9 (4) | 0.8 (3) | 2.7 (3) | 0.6 (2) |
| 242 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.4 (7) | 0.7 (1) | 1.4 (5) | 0.9 (1) | 1.6 (5) |
| 382 | AB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.0 (1) | 0.7 (1) | 1.1 (4) | 0.9 (1) | 0.6 (2) |
| 413 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1.0 (5) | 1.5 (2) | 0.8 (3) | 1.8 (2) | 1.0 (3) |
| 9 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.8 (4) | 2.2 (3) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 1.0 (3) |
| 13 | AB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.8 (4) | 1.5 (2) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 1.0 (3) |
| 118 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.8 (4) | 2.9 (4) | 0.0 (0) | 3.6 (4) | 0.0 (0) |
| 19 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.6 (3) | 0.0 (0) | 0.8 (3) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| 21 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.6 (3) | 0.0 (0) | 0.8 (3) | 0.0 (0) | 1.0 (3) |
| 18 | AB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.7 (1) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 28 | AB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.7 (1) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| 68 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.7 (1) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| 73 | BB | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 78 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 81 | BB | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 104 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| 394 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 1.5 (2) | 0.0 (0) | 0.9 (1) | 0.3 (1) |
| 427 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.7 (1) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.3 (1) |
| 595 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 1.5 (2) | 0.0 (0) | 1.8 (2) | 0.0 (0) |
| 11 | AB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 14 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| 17 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| 22 | AB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 24 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 25 | AB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 31 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 33 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 46 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 51 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 69 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| 70 | BB | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.0 (0) |
| 75 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 86 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 89 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 195 | AA | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 206 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 300 | BB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 1.6 (5) |
| 349 | BB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 355 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 381 | AB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 416 | BB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| 467 | BB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI01 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.6 (3) | 1.5 (2) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| CIENI02 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.6 (3) | 0.0 (0) | 0.8 (3) | 1.8 (2) | 0.3 (1) |
| CIENI03 | BB | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| CIENI04 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| CIENI05 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) |
| CIENI06 | BB | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| CIENI07 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI08 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI09 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI10 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI11 | BB | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |

Figura 25 Diversidad genética KIR en la cohorte de estudio

Se muestran los datos de 511 individuos no relacionados infectados por el VIH. La presencia (cuadros grises) y ausencia (cuadros blancos) de los 16 genes KIR permitió la identificación de 65 genotipos diferentes en la cohorte de estudio. La frecuencia de cada genotipos se muestra en porcentaje (%F) y se define como el número de individuos que presentan el genotipo (N) dividido por el número de individuos estudiados. Los nuevos genotipos se designaron como CIENI#, ya que fueron tipificados en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Basados en el contenido genético, los genotipos se agruparon de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología. Las frecuencias de los genotipos por región geográfica (Norte y Centro-Sur) y por proporción de componentes ancestrales (EUR y AMI) se muestran. No se encontraron diferencias significativas

Adicionalmente, buscamos posibles diferencias en las frecuencias entre los genotipos y haplotipos KIR dependiendo de la ubicación geográfica o las proporciones genéticas ancestrales. No encontramos diferencias de frecuencias en los genotipos o haplotipos descritos para los individuos del Norte y Centro-Sur, así como para individuos con mayor componente ancestral EUR o AMI de la cohorte. Considerando las ubicación geográfica, la única diferencia observada fue con el sub-grupo de CxT4 de los haplotipos Bx siendo más frecuente en individuos provenientes del Norte ($p=0.007$) (Tabla 6).

Tabla 6 Genotipos, Haplotipos y sub-grupos Bx en la cohorte de estudio por región geográfica y proporciones ancestrales

| | Haplogrupo | | Subtipo Bx | | | | Grupo de genes | |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|-------------|----------------|---------------|
| | AA | Bx | CxTx | CxT4 | C4Tx | C4T4 | C4 | T4 |
| | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) | %F (N) |
| Todos (n=511) | 34.6 (177) | 65.4 (334) | 20.7 (106) | 31.1 (159) | 9.2 (47) | 4.3 (22) | 13.5 (69) | 35.4 (181) |
| Norte (n=137) | 29.2 (40) | 70.8 (97) | 17.5 (24) | 40.1 (55) | 10.2 (14) | 2.9 (4) | 13.1 (18) | 43.1 (59) |
| Centro-Sur (n=368) | 36.4 (134) | 63.6 (234) | 22.3 (82) | 27.5 (101) | 9.0 (33) | 4.9 (18) | 13.9 (51) | 32.3 (119) |
| Valor p | NS | NS | NS | 0.007 | NS | NS | NS | NS |
| EUR >50% (n=110) | 30.0 (30) | 70.0 (77) | 19.1 (21) | 38.2 (42) | 10.9 (12) | 1.8 (2) | 12.7 (14) | 40.0 (44) |
| AMI >50% (n=300) | 37.0 (111) | 63.0 (189) | 21.0 (63) | 32.0 (96) | 7.7 (23) | 2.3 (7) | 10.0 (30) | 34.3 (103) |
| Valor p | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |

NS, no significativo

9.3 Perfil Genético HLA

9.3.1 Distribución de alelos HLA y motivos serológicos

Los alelos HLA y sus motivos serológicos se obtuvieron en este estudio para explorar posibles diferencias geográficas o genéticas que pudieran tener un efecto en el control de la infección por VIH en la población mexicana. Se observaron un total de 164 alelos, de los cuales: 43 fueron HLA-A, 87 fueron HLA-B y 34 fueron HLA-C. Los alelos HLA-A más frecuentes en la población de estudio fueron A*02:01 (frecuencia alélica 0.214) y A*24:02 (0.145); los alelos HLA-B más frecuentes observados fueron B*40:02 (0.062), B*35:01 (0.059), B*51:01 (0.058) y B*39:05 (0.056); los alelos HLA-C más frecuentes fueron C*04:01 (0.182) y C*07:02 (0.180). Los alelos A*02:06, B*39:02, C*03:02, C*03:05 y C*07:02 se observaron con mayor frecuencia en individuos con mayor componente ancestral AMI ($p<0.05$, $q<0.2$),

mientras que los alelos A*03:01, A*33:01, B*27:05, B*44:02, C*02:02, C*05:01 y C*07:01 se observaron en mayor frecuencia en los individuos con mayor proporción ancestral EUR ($p < 0.05$, $q < 0.2$) (Tabla 7) No se encontraron diferencias en las frecuencias de alelos HLA considerando la región geográfica. La lista completa de frecuencias HLA y sus comparaciones entre individuos del Norte y Centro-Sur o proporciones ancestrales EUR y AMI se pueden encontrar en el Anexo 2.

Tabla 7. Frecuencias HLA en los individuos de la población de estudio

| Alelos HLA | Todos (n=511) FA (%) | Norte (n=137) FA (%) | Centro-Sur (n=368) FA (%) | Valor p | Valor q | EUR (>50%) (n=110) FA (%) | AMI (>50%) (n=300) FA (%) | Valor p | Valor q |
|------------|----------------------|----------------------|---------------------------|---------|---------|---------------------------|---------------------------|--------------|--------------|
| A*02:06 | 0.085 (16.8) | 0.066 (13.1) | 0.092 (18.2) | 0.228 | 0.603 | 0.050 (10.0) | 0.096 (19.0) | 0.035 | 0.190 |
| A*03:01 | 0.054 (10.8) | 0.084 (16.8) | 0.044 (8.7) | 0.015 | 0.325 | 0.078 (15.5) | 0.042 (8.3) | 0.043 | 0.190 |
| A*33:01 | 0.020 (3.9) | 0.022 (4.4) | 0.019 (3.8) | 0.799 | 0.795 | 0.041 (8.2) | 0.015 (3.0) | 0.031 | 0.190 |
| B*27:05 | 0.022 (4.3) | 0.026 (5.1) | 0.021 (4.1) | 0.627 | 0.747 | 0.041 (8.2) | 0.015 (3.0) | 0.012 | 0.190 |
| B*39:02 | 0.022 (4.3) | 0.026 (5.1) | 0.021 (4.1) | 0.627 | 0.747 | 0 (0.0) | 0.022 (4.3) | 0.024 | 0.190 |
| B*44:02 | 0.020 (3.9) | 0.033 (6.6) | 0.015 (3.0) | 0.075 | 0.460 | 0.041 (8.2) | 0.010 (2.0) | 0.006 | 0.190 |
| C*02:02 | 0.028 (5.5) | 0.022 (4.4) | 0.030 (6.0) | 0.662 | 0.752 | 0.059 (11.8) | 0.018 (3.7) | 0.004 | 0.190 |
| C*03:03 | 0.042 (8.6) | 0.033 (6.6) | 0.046 (9.2) | 0.376 | 0.639 | 0.018 (3.6) | 0.050 (10.0) | 0.043 | 0.190 |
| C*03:05 | 0.017 (3.3) | 0.004 (0.7) | 0.022 (4.3) | 0.051 | 0.330 | 0 (0.0) | 0.023 (4.7) | 0.026 | 0.190 |
| C*05:01 | 0.040 (7.2) | 0.051 (10.2) | 0.031 (6.3) | 0.129 | 0.517 | 0.064 (12.7) | 0.028 (5.7) | 0.021 | 0.190 |
| C*07:01 | 0.073 (14.7) | 0.073 (14.6) | 0.075 (14.9) | 1.000 | 0.898 | 0.114 (22.7) | 0.059 (11.7) | 0.007 | 0.190 |
| C*07:02 | 0.180 (35.8) | 0.146 (29.2) | 0.186 (37.0) | 0.116 | 0.517 | 0.114 (22.7) | 0.193 (38.3) | 0.003 | 0.190 |

La frecuencia alélica (FA) se define como la proporción de alelos específicos HLA sobre el total de alelos HLA observados para el mismo locus. El porcentaje se define como el número de individuos que poseen el alelo HLA dividido por el número total de individuos en la cohorte. Sólo se muestran los alelos HLA que mostraron diferencias ($p < 0.05$, $q < 0.2$) entre los grupos de comparación.

El motivo serológico Bw4 se observó con mayor frecuencia en los individuos del Norte ($p = 0.035$, $q = 0.084$) así como en individuos con mayor proporción ancestral EUR ($p = 0.005$, $q = 0.048$). C2 se observó con mayor frecuencia en la región del Centro-Sur ($p = 0.039$, $q = 0.084$); mientras que C1 se observó con mayor frecuencia en individuos con una mayor proporción ancestral EUR ($p = 0.010$, $q = 0.048$) (Tabla 8)

Tabla 8. Motivos serológicos en la cohorte de estudio

| Motivos Serológicos HLA | Todos (n=511) %F(N) | Norte (n=137) %F(N) | Centro-Sur (n=368) %F(N) | Valor p | Valor q | EUR (>50%) (n=110) %F(N) | AMI (>50%) (n=300) %F(N) | Valor p | Valor q |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| Bw4 | 45.4 (231) | 53.3 (73) | 42.4 (156) | 0.035 | 0.084 | 58.2 (64) | 42.7 (128) | 0.005 | 0.048 |
| Bw4^{80IIIe} | 31.3 (160) | 36.5 (50) | 29.6 (109) | 0.878 | 0.431 | 33.6 (37) | 31.0 (93) | 0.072 | 0.106 |
| Bw6 | 91.5 (465) | 87.6 (120) | 92.1 (339) | 0.073 | 0.110 | 87.3 (96) | 91.3 (274) | 0.245 | 0.230 |
| C1 | 55.8 (284) | 59.9 (82) | 54.3 (200) | 0.314 | 0.250 | 65.5 (72) | 50.7 (152) | 0.010 | 0.048 |
| C2 | 86.4 (440) | 80.3 (110) | 88.0 (324) | 0.039 | 0.084 | 83.6 (92) | 88.3 (265) | 0.177 | 0.179 |

La frecuencia (%F) de cada gen esta expresada en porcentaje y se define como el número de individuos que presentan el motivo serológico (N) dividido por el número de individuos correspondiente para cada grupo de comparación. Los valores de *p* y *q* significativos se muestran en negritas.

9.4 Efecto del perfil genético KIR y HLA sobre la progresión a la infección por VIH

Debido a la riqueza encontrada en la cohorte mexicana en KIR y HLA, así como las diferencias encontradas en los genes KIR, HLA, haplotipos y motivos serológicos comparando las regiones del Norte y Centro-Sur y las proporciones ancestrales EUR y AMI; decidimos buscar los efectos que pudieran existir sobre el conteo de linfocitos T CD4⁺, el conteo de linfocitos T CD8⁺, la razón de linfocitos T CD4⁺: T CD8⁺, el setpoint viral de VIH y el Z-score corrigiendo por las proporciones genéticas ancestrales y otras variables confusoras. El análisis de múltiples correspondencias de los datos (MCA) considerando el perfil genético KIR y HLA así como los SNPs considerados para la tipificación ancestral demostró que la población en estudio no presentaba estructura, confirmando que la cohorte en estudio es genéticamente imparcial (Figura 26B). De hecho, el análisis de componentes principales, sólo explica el 3.3% de la varianza con otros componentes contribuyendo en menor proporción (Figura 26A).

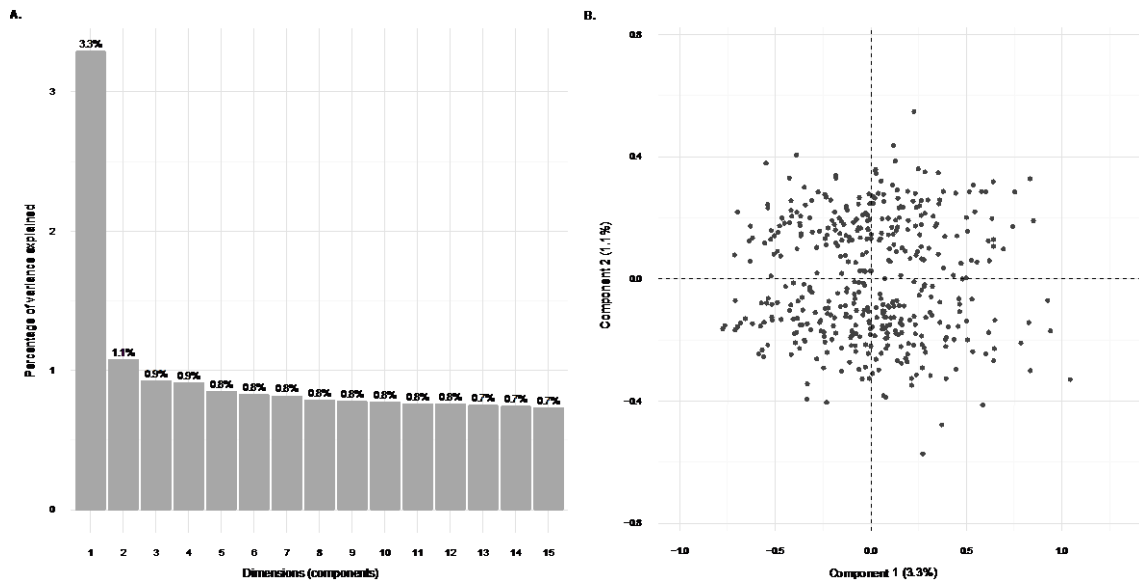


Figura 26. Análisis de Correspondencias Múltiples (MCA).

Se aplicó el análisis de correspondencias múltiples (MCA) en todas las variables independientes genéticas (SNPs, alelos HLA y genes KIR) para determinar si la población de estudio presentaba estructura. A) Contribución de los primeros 15 componentes para explicar la varianza de la muestra. B) Distribución de los individuos de acuerdo a los componentes 1 y 2.

Realizamos un análisis multivariado para evaluar el efecto que los genes KIR y HLA pudieran tener sobre la progresión a la infección por VIH, corrigiendo por variables confusoras. Se encontraron un total de 185 asociaciones significativas ($p < 0.05$) para los conteos de linfocitos T CD4⁺, conteos de linfocitos T CD8⁺, razón linfocitos T CD4⁺: T CD8⁺, setpoint viral y Z-score en el análisis univariado. Todas las variables que mostraron valores p significativos en el análisis univariado se consideraron como variables confusoras para el análisis multivariado. Considerando los ajustes mencionados, sólo 54 asociaciones, todas ellas con alelos HLA, permanecieron significativas con una $q < 0.2$. No se observaron asociaciones con los genes KIR, sus haplotipos o las combinaciones KIR-HLA (Tabla 9). Corrigiendo por la ancestría genética, A*01:01, B*14:02 y B*27:05 se asociaron con conteos altos de linfocitos T CD4⁺, mientras que A*02:06 se asoció con bajos conteos de linfocitos T CD4⁺. B*35:01, B*49:01, C*07:01 y C*17:01 se asociaron con conteos altos de linfocitos T CD8⁺.

Tabla 9. Factores genéticos involucrados en la progresión a la enfermedad

| Variable Clínica | Factor Genético | Corrección | Estimado ^a | Valor p | Valor q | Variables Confusoras ^b | |
|---|---|------------|-----------------------|----------|---------|---|-------------------------------|
| Conteo linfocitos T CD4 ⁺ (células/μl) | A*01:01 | KIR | 0.0017 | 0.007 | 0.161 | edad; género | |
| | | Ancestría | 0.0017 | 0.007 | 0.161 | edad; género | |
| | | HLA | 0.0015 | 0.024 | 0.199 | B*27:05; B*14:02; A*02:06; A*33:01; A*02:01; B*39:01; B*27:05_C*02:02; edad; género | |
| | A*02:06 | KIR | -0.0015 | 0.023 | 0.198 | edad; género | |
| | | Ancestría | -0.0015 | 0.023 | 0.198 | edad; género | |
| | | HLA | -0.0017 | 0.018 | 0.196 | A*01:01; B*27:05; B*14:02; A*33:01; A*02:01; B*39:01; B*27:05_C*02:02; age; gender | |
| | B*14:02 | KIR | 0.0015 | 0.021 | 0.196 | edad; género | |
| | | Ancestría | 0.0015 | 0.021 | 0.196 | edad; género | |
| | B*27:05 | KIR | 0.0021 | 0.010 | 0.194 | edad; género | |
| | | Ancestría | 0.0021 | 0.010 | 0.194 | edad; género | |
| | Conteo linfocitos T CD8 ⁺ (células/μl) | B*35:01 | KIR | 0.0005 | 0.013 | 0.194 | KIR2DS4*003-007; edad; género |
| | | | Ancestría | 0.0005 | 0.012 | 0.194 | edad; género |
| HLA | | | 0.0010 | 0.10 | 0.194 | edad; género | |
| B*49:01 | | KIR | 0.0012 | 8.04E-05 | 0.005 | KIR2DS4*003-007; edad; género | |
| | | Ancestría | 0.0012 | 2.88E-05 | 0.002 | edad; género | |
| | | HLA | 0.0010 | 0.010 | 0.194 | B*35:01; C*17:01; B*13:02; C*07:01; B*40:02; edad; género | |
| C*07:01 | | Ancestría | 0.0004 | 0.020 | 0.196 | edad; género | |
| C*17:01 | | KIR | 0.0008 | 0.006 | 0.157 | KIR2DS4*003-007; edad; género | |
| | | Ancestría | 0.0007 | 0.013 | 0.194 | edad; género | |

| | | | | | | |
|--|--------------|-----------|---------|-------|-----------------------|---|
| Razón linfocitos T CD4+ : T CD8+ | A*30:02 | KIR | 1.3105 | 0.019 | 0.196 | KIR2DP1; edad; género |
| | | Ancestría | 1.3467 | 0.015 | 0.194 | edad; género |
| | B*27:05 | KIR | 1.4822 | 0.006 | 0.157 | KIR2DP1; edad; género |
| | | Ancestría | 1.5239 | 0.005 | 0.155 | edad; género |
| | B*27:05_C*02 | KIR | 1.1802 | 0.021 | 0.196 | KIR2DP1; edad; género |
| | :02 | Ancestría | 1.2240 | 0.016 | 0.194 | edad; género |
| | B*48:01 | KIR | 1.1292 | 0.022 | 0.196 | KIR2DP1; edad; género |
| | | Ancestría | 1.1812 | 0.016 | 0.194 | edad; género |
| | B*48:01_C*08 | KIR | 0.9955 | 0.021 | 0.196 | KIR2DP1; edad; género |
| | :01 | Ancestría | 1.0503 | 0.014 | 0.194 | edad; género |
| | | KIR | -5.6920 | 0.007 | 0.157 | KIR2DP1; edad; género |
| | | Ancestría | -5.6299 | 0.008 | 0.164 | edad; género |
| | B*49:01 | HLA | -5.6428 | 0.008 | 0.194 | C*08:01; C*03:03; B*48:01_C*08:01; B*27:05; A*30:02; C*02:02; C*17:01; B*48:01; B*27:05_C*02:02; edad; género |
| | C*02:02 | KIR | 1.3336 | 0.010 | 0.194 | KIR2DP1; edad; género |
| | | Ancestría | 1.3735 | 0.006 | 0.157 | edad; género |
| | | KIR | 1.1998 | 0.009 | 0.190 | KIR2DP1; edad; género |
| | | Ancestría | 1.2418 | 0.007 | 0.160 | edad; género |
| | C*03:03 | HLA | 1.3404 | 0.006 | 0.157 | C*08:01; B*49:01; B*48:01_C*08:01; B*27:05; A*30:02; C*02:02; C*17:01; B*48:01; B*27:05_C*02:02; edad; género |
| | C*08:01 | KIR | 1.1958 | 0.006 | 0.157 | KIR2DP1; edad; género |
| | | Ancestría | 1.2494 | 0.004 | 0.155 | edad; género |
| C*17:01 | KIR | -3.8137 | 0.015 | 0.194 | KIR2DP1; edad; género | |
| | Ancestría | -3.8325 | 0.014 | 0.194 | edad; género | |
| Setpoint viral en plasma (log RNA) | A*31:01 | KIR | -0.408 | 0.014 | 0.194 | age; gender |
| | | Ancestría | -0.408 | 0.014 | 0.194 | age; gender |
| | | HLA | -0.416 | 0.014 | 0.194 | C*08:01; B*40:02; |

| copias/ml) | | | | | | B*48:01_C*08:01; age; gender |
|------------|---------|-----------|--------|-------|-------|--|
| | C*08:01 | KIR | -0.486 | 0.012 | 0.194 | age; gender |
| | | Ancestría | -0.486 | 0.012 | 0.194 | age; gender |
| Z-score | A*01:01 | KIR | 0.4158 | 0.021 | 0.196 | KIR2DS4, edad, género |
| | | Ancestría | 0.4110 | 0.022 | 0.196 | edad; género |
| | | HLA | 0.4350 | 0.015 | 0.194 | B*14:02; C*08:01; B*27:05; edad; género |
| | B*14:02 | KIR | 0.4352 | 0.021 | 0.196 | KIR2DS4, edad, género |
| | | Ancestría | 0.4363 | 0.020 | 0.196 | edad; género |
| | | HLA | 0.5489 | 0.006 | 0.157 | C*08:01; A*01:01; B*27:05; edad; género |
| | B*27:05 | KIR | 0.5563 | 0.019 | 0.196 | KIR2DS4, edad, género |
| | | Ancestría | 0.5378 | 0.022 | 0.197 | edad; género |
| | C*08:01 | HLA | 0.4731 | 0.016 | 0.194 | B*14:02; A*01:01; B*27:05; edad; género |

^aModelo de regresión logística

^bTodos los valores significativos (p<0.05) obtenidos en el análisis univariado se usaron como variables confusoras

Considerando la razón de linfocitos T CD4+: T CD8+, los alelos A*30:02, B*27:05, B*48:01, C*02:02, C*03:03, C*08:01 y las combinaciones de los alelos B*27:05 junto con C*02:02 y B*48:01 junto con C*08:01 se asociaron a una alta razón (Tabla 9); mientras que los alelos B*49:01 y C*17:01 se asociaron a una baja razón (Tabla 9). A*31:01 y C*08:08 se asociaron con bajos niveles de setpoint viral (Tabla 9). Aunado a esto, A*01:01, B*14:02, B*27:05 y C*08:08 se asociaron a niveles altos de Z-score (Tabla 9).

10. Discusión

Se ha invertido mucho esfuerzo en detectar variables genéticas asociadas a la progresión en la infección por VIH. Sin embargo, variaciones relevantes funcionales y clínicas pueden ser raras o poblacionalmente específicas requiriendo estudios en diversas poblaciones humanas que permitan la identificación de nuevos factores de riesgo o protección. Actualmente, la mayoría de la población mexicana es mestiza, incluyendo no sólo ancestría indígena sino también europea y africana (Moreno-Estrada et al. 2014). Esta característica nos da la oportunidad de buscar nuevos factores genéticos que pudieran estar asociados a la infección por VIH. El presente estudio representa el primer intento para identificar la influencia de la estratificación genética sobre los perfiles de genes KIR y frecuencias de HLA en una cohorte nacional de mestizos mexicanos infectados por el VIH. La cohorte incluye individuos de los estados más afectados por la epidemia de VIH en México, con una gran representación de las regiones del centro y sur del país (Figura 23. Distribución geográfica de la cohorte)(CENSIDA 2014). A pesar de los sesgos de muestreo presente en el estudio, nuestra cohorte es hasta la fecha la más rica genéticamente y representativa de la población Mexicana cuyo principal objetivo es describir el impacto que la diversidad genética de KIR y HLA puedan tener en la enfermedad por el VIH. Aunado a esto, la caracterización de las proporciones genéticas ancestrales permite explorar las diferencias en frecuencias de los genes KIR y los alelos HLA, así como efectos específicos de los genes KIR, alelos HLA o su combinación sobre la infección del VIH en una misma población.

Observamos una gran similitud en las distribuciones de los genes KIR y sus genotipos en la cohorte entre individuos con mayor componente ancestral EUR y AMI, aunque se observaron diferencias cuando se comparan los individuos de la región del norte y centro-sur (Tabla 6, 7, 8 y 9). De forma interesante, las diferencias observadas entre las regiones y considerando la estratificación genética fueron más frecuentes entre los haplotipos B de los genes KIR. Los haplotipos B tienen diferentes números de genes KIR activadores. El papel de los genes KIR activadores en la respuesta inmune sigue siendo enigmático; sin embargo, diversos estudios

sugieren que los genes activadores juegan un papel importante en la activación de las células NK (Carr et al. 2007; Chewing et al. 2007; Lanier 2001). Estudios de infecciones virales en individuos mexicanos han demostrado que los genes KIR activadores se asocian a protección (Aranda-Romo et al. 2012). Sin embargo, nuestros análisis no mostraron genes KIR, haplotipos o genotipos asociados a la progresión de la infección por VIH. Inclusive la asociación de protección previamente descrita KIR3DL1/HLA-Bw4^{8011e} no se observó. Es posible que el poder estadístico se insuficiente para detectar asociaciones con genes KIR debido al número pequeño de individuos considerados en el análisis, también es posible que estas asociaciones no estén presentes o sean muy débiles para ser detectadas en el contexto inmunogenético de la cohorte de estudio con una diversidad característica de combinaciones KIR-HLA.

Nuestras observaciones contrastan con estudios previos en mestizos mexicanos infectados por el VIH en donde se muestran conteos altos de linfocitos T CD4⁺ en individuos que presentan KIR3DL1/S1 en combinación con HLA-Bw4 (Hernandez-Ramirez et al. 2015). No obstante, este estudio se centró en la presencia de genes KIR y motivos serológicos HLA relevantes sin considerar otros factores genéticos o confusores. Aunado a esto, el estudio se llevó a cabo en una cohorte de individuos provenientes de un estado de la región norte del país en donde es posible que los individuos posean mayor proporción de genes EUR comparado con nuestra cohorte de estudio. Además, otros estudios han sugerido la necesidad de realizar la tipificación de los genes KIR a alta resolución (Martin et al. 2007), así como la determinación del número de copias de los genes KIR (Pelak et al. 2011) para poder detectar nuevas asociaciones KIR-HLA implicadas en la respuesta a infecciones incluyendo al VIH. Un análisis más detallado de los alelos KIR o el número de copias presentes puede dejar al descubierto asociaciones específicas de la población en donde los análisis de contenido genético no lo permiten. Cabe mencionar, que en el estudio se observaron algunas asociaciones esperadas que soportan el efecto protector de HLA-Bw4 y KIR3DL1 como lo es la combinación de B*27:05 con KIR3DL1 y altos conteos de linfocitos T CD4⁺ y Z-score. Sin embargo, la significancia de estas asociaciones se pierde cuando se corrige por múltiples comparaciones ($p < 0.05$, q no significativo en todos los casos).

En contraste con la distribución de los genes KIR, la frecuencia de los alelos HLA mostró marcadas diferencias entre individuos con altas proporciones ancestrales AMI y EUR. De forma esperada, alelos HLA típicamente Amerindios (IPD-IMGT/HLA) se observaron en mayor frecuencia en individuos con alta proporción genética ancestral AMI incluyendo los alelos A*02:06, B*39:02 y C*03:05. Por otro lado, alelos HLA Caucásicos (IPD-IMGT/HLA) se vieron enriquecidos en individuos con mayor proporción ancestral EUR incluyendo los alelos A*03:01, A*33:01, B*27:05, B*44:02, C*02:02 y C*05:01 (Tabla 7). De forma interesante, después de corregir por la estratificación genética, las únicas asociaciones que permanecieron

significativas para la progresión a la infección por VIH incluyen alelos HLA individualmente, algunos de los cuales ya se habían reportado previamente como factores genéticos de protección para la infección por VIH (B*14:02, B*27:05) (Goulder and Watkins 2008). Otros, sin embargo, pueden representar nuevos factores de riesgo como lo es A*02:06, un alelo asociado a conteos bajos de linfocitos T CD4⁺ y que además se encuentra en mayor frecuencia en individuos con una mayor proporción genética ancestral AMI.

Es de destacar que algunas de las combinaciones KIR-HLA con valores *p* y *q* significativos antes del ajuste por múltiples comparaciones, también pueden ser de interés y representar nuevas asociaciones, incluso cuando se pierde la significancia después de las correcciones por variables confusoras. Es interesante señalar que el alelo C*08:01 se asoció consistentemente con resultados positivos clínicos (Carga Viral, Z-score) en combinación con KIR2DL5, 2DS5 y 2DS1 que son parte del haplotipo KIR telomérico. Esto podría sugerir una posible interacción entre C*08:01 y KIR2DS5/2DL5, es necesario realizar ensayos funcionales para confirmar estas posibles asociaciones novedosas. Dado que la significancia de estas asociaciones no se mantiene en el análisis multivariado, podrían representar asociaciones débiles que no pueden ser detectadas con nuestro diseño de estudio.

Existen pocas poblaciones que han sido estudiadas a profundidad en relación a sus frecuencias de HLA y KIR y sus posibles interacciones. Nuestro trabajo proporciona una buena oportunidad para comparar a la población mexicana mestiza con otras poblaciones que se describen a fondo y que podría darnos una idea de la evolución selectiva de genes KIR y HLA en diferentes poblaciones. Es interesante señalar que hay una frecuencia mayor de HLA C2 (86.4%) en los mexicanos en contraste con otras poblaciones nativas como lo son los amerindios Yucpa (17.2%) (Gendzekhadze et al. 2009) y los maoríes y polinesios de las islas del Pacífico (27.9% y 37.7%, respectivamente, $p < 0.0001$) (Nemat-Gorgani et al. 2014). También hay que resaltar la baja prevalencia de ligandos KIR HLA-B en todas estas poblaciones nativas (9.8% para Yucpa, 2% de los maoríes, el 3% de los polinesios) en comparación con los mestizos mexicanos (45.4%, $p > 0.0001$ en todos los casos). De hecho, dentro de la cohorte mestiza mexicana, los individuos con mayor proporción ancestral AMI mostraron menores frecuencias de HLA-Bw4 que los individuos con mayor proporción ancestral EUR. Estas observaciones sugieren que las frecuencias de los ligandos KIR pueden mostrar distribuciones divergentes entre las diferentes poblaciones, lo que podría dar lugar a la diversidad específica de combinaciones KIR-HLA que influyan en la educación de las células NK y la respuesta a la infección.

Es importante señalar que los individuos con una mayor proporción ancestral AMI mostraron bajos conteos de linfocitos T CD4⁺. Si el conteo de linfocitos T CD4⁺, en individuos no infectados por el VIH y con una mayor proporción ancestral AMI es menor por sí mismo que

el de individuos con una mayor proporción ancestral EUR es desconocido ya que no hay datos disponibles. Sin embargo, este efecto también podría estar asociado con alelos HLA tales como A*02:06 o inclusive por otros factores genéticos diferentes a HLA o KIR.

11. Conclusión

En el presente estudio hemos demostrado las frecuencias únicas de HLA y KIR en la población mexicana, y hemos evidenciado las diferencias en los perfiles genéticos de HLA y KIR entre las regiones del norte y centro-sur del país y entre individuos con mayor proporción ancestral AMI y EUR y que estas diferencias podrían estar reflejando diferencias sutiles en la evolución de la enfermedad del VIH en el país. Después de corregir por la estratificación genética, sólo los alelos HLA de forma individual se asociaron con la progresión a la enfermedad por el VIH sin efectos significativos por KIR. Esto podría sugerir efectos modestos o débiles por KIR-HLA que afectan a la progresión del VIH a nivel poblacional, las cuales necesitan estudios con mayor poder para permitir detectar éstas. Se necesitan estudios con tamaños de muestra más grandes y con una mayor resolución del perfil genético KIR para poder evidenciar asociaciones adicionales. Nuestros resultados ponen de manifiesto las ventajas de considerar una estratificación genética detallada dentro de las poblaciones en el estudio de los perfiles genéticos que podrían estar implicados en los estudios de asociación a enfermedades.

12. Referencias

- Abul K. Abbas AHL (2003) Cellular and Molecular Immunology. In: Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition edn. Elsevier Science, Philadelphia, pp 275-297
- Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna T, Pajukanta P (2014) Genetic and environmental determinants of the susceptibility of Amerindian derived populations for having hypertriglyceridemia *Metabolism: clinical and experimental* 63:887-894 doi:10.1016/j.metabol.2014.03.012
- Ahlenstiel G, Martin MP, Gao X, Carrington M, Rehermann B (2008) Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses *The Journal of clinical investigation* 118:1017-1026 doi:10.1172/JCI32400
- Alter G et al. (2007) Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes *J Exp Med* 204:3027-3036 doi:jem.20070695 [pii] 10.1084/jem.20070695
- An P et al. (2007) Polymorphisms of CUL5 are associated with CD4+ T cell loss in HIV-1 infected individuals *PLoS Genet* 3:e19 doi:10.1371/journal.pgen.0030019

- An P et al. (2009) APOBEC3B deletion and risk of HIV-1 acquisition *J Infect Dis* 200:1054-1058 doi:10.1086/605644
- An P et al. (2002) Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10002-10007 doi:10.1073/pnas.142313799
- Andre P et al. (2001) New nomenclature for MHC receptors *Nat Immunol* 2:661 doi:10.1038/90589
- Anfossi N et al. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I *Immunity* 25:331-342 doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013
- Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL (1998) CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research *Lancet* 351:1632-1633
- Aranda-Romo S, Garcia-Sepulveda CA, Comas-Garcia A, Lovato-Salas F, Salgado-Bustamante M, Gomez-Gomez A, Noyola DE (2012) Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in severe A (H1N1) 2009 influenza infections *Immunogenetics* 64:653-662 doi:10.1007/s00251-012-0623-3
- Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM, Riley EM (2003) Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes *J Immunol* 171:5396-5405
- AVERT. <http://www.avert.org/worldstats.htm>.
- Barbour JD, Sriram U, Caillier SJ, Levy JA, Hecht FM, Oksenberg JR (2007) Synergy or independence? Deciphering the interaction of HLA Class I and NK cell KIR alleles in early HIV-1 disease progression *PLoS Pathog* 3:e43 doi:10.1371/journal.ppat.0030043
- Barquera R et al. (2008) HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico *Mol Immunol* 45:1171-1178 doi:S0161-5890(07)00670-0 [pii] 10.1016/j.molimm.2007.07.042
- Barrow AD, Trowsdale J (2008) The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses *Immunol Rev* 224:98-123 doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00653.x
- Bashirova AA et al. (2014) LILRB2 interaction with HLA class I correlates with control of HIV-1 infection *PLoS Genet* 10:e1004196 doi:10.1371/journal.pgen.1004196
- Bautista-Arredondo S, Colchero, M.A., Sosa-Rubí, S.G., Romero, M., Conde, C. (2012a) Diagnóstico situacional, mapeo de sitios de encuentro y evaluación de impacto de las estrategias de prevención en México. Informe sobre la encuesta en sitios de encuentro de HSH SS/Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)
- Bautista-Arredondo S, Colchero, M.A., Sosa-Rubí, S.G., Romero, M., Conde, C. (2012b) Diagnóstico situacional, mapeo de sitios de encuentro y evaluación de impacto de las estrategias de prevención en México. Informe sobre la encuesta en sitios de UDI SS/Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)
- Beltrán GA (1989) La población negra de México: estudio etnohistórico. vol v. 2. Fondo de Cultura Económica,
- Biassoni R et al. (1995) Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones *J Exp Med* 182:605-609
- Bisio F, Bozzano F, Marras F, Di Biagio A, Moretta L, De Maria A (2013) Successfully treated HIV-infected patients have differential expression of NK cell receptors

- (NKp46 and NKp30) according to AIDS status at presentation *Immunol Lett* 152:16-24 doi:10.1016/j.imlet.2013.03.003
- Blery M, Olcese L, Vivier E (2000) Early signaling via inhibitory and activating NK receptors *Hum Immunol* 61:51-64
- Boulet S et al. (2008a) A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection *AIDS* 22:1487-1491 doi:10.1097/QAD.0b013e3282ffde7e
- Boulet S, Sharafi S, Simic N, Bruneau J, Routy JP, Tsoukas CM, Bernard NF (2008b) Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals *AIDS* 22:595-599 doi:10.1097/QAD.0b013e3282f56b23
- Boyton RJ et al. (2006) HLA-C and killer cell immunoglobulin-like receptor genes in idiopathic bronchiectasis *American journal of respiratory and critical care medicine* 173:327-333 doi:10.1164/rccm.200501-124OC
- Braud VM et al. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C *Nature* 391:795-799 doi:10.1038/35869
- Brenchley JM et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection *Nature medicine* 12:1365-1371 doi:10.1038/nm1511
- Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM (2007) Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications *J Virol* 81:10209-10219 doi:10.1128/JVI.00872-07
- Calleja JM, Walker N, Cuchi P, Lazzari S, Ghys PD, Zacarias F (2002) Status of the HIV/AIDS epidemic and methods to monitor it in the Latin America and Caribbean region *AIDS* 16 Suppl 3:S3-12
- Cantoni C et al. (1998) p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily *Eur J Immunol* 28:1980-1990 doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199806)28:06<1980::AID-IMMU1980>3.0.CO;2-F
- Carr WH, Little AM, Mocarski E, Parham P (2002) NK cell-mediated lysis of autologous HCMV-infected skin fibroblasts is highly variable among NK cell clones and polyclonal NK cell lines *Clin Immunol* 105:126-140
- Carr WH, Pando MJ, Parham P (2005) KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand *J Immunol* 175:5222-5229
- Carr WH, Rosen DB, Arase H, Nixon DF, Michaelsson J, Lanier LL (2007) Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation *J Immunol* 178:647-651 doi:10.1182/178/2/647 [pii]
- Carrington M, Martin MP, van Bergen J (2008) KIR-HLA intercourse in HIV disease *Trends Microbiol* 16:620-627 doi:10.1016/j.tim.2008.09.002
- Carrington M et al. (1999) HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage *Science* 283:1748-1752
- Carrington M, O'Brien SJ (2003) The influence of HLA genotype on AIDS *Annu Rev Med* 54:535-551 doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152346
- Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M (1994) NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80 *J Exp Med* 180:1235-1242
- CENSIDA (2012) El VIH/SIDA en México 2012. Secretaría de Salud 2012,
- CENSIDA (2014) Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA: Actualización al cierre de 2014.

<http://www.censida.salud.gob.mx/interior/cifras.html>. Accessed 04/junio/2015
2015

- Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D (1999) The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells *Immunity* 10:661-671
- Cohen J (2006) HIV/AIDS: Latin America & Caribbean. Mexico: prevention programs target migrants *Science* 313:478-479 doi:10.1126/science.313.5786.478
- Colonna M, Samaridis J (1995) Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells *Science* 268:405-408
- Colonna M et al. (1992) Alloantigen recognition by two human natural killer cell clones is associated with HLA-C or a closely linked gene *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7983-7985
- Cook M et al. (2006) Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation *Blood* 107:1230-1232 doi:10.1182/blood-2005-03-1039
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001a) The biology of human natural killer-cell subsets *Trends in immunology* 22:633-640
- Cooper MA et al. (2001b) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset *Blood* 97:3146-3151
- Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D (2000) Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires *Tissue Antigens* 56:313-326
- Chakrabarti LA, Simon V (2010) Immune mechanisms of HIV control *Current opinion in immunology* 22:488-496 doi:10.1016/j.coi.2010.06.006
- Chan A et al. (2007) CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts *J Immunol* 179:89-94
- Chan HW et al. (2003) DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells *J Exp Med* 197:245-255
- Chen R et al. (2012) Type 2 diabetes risk alleles demonstrate extreme directional differentiation among human populations, compared to other diseases *PLoS Genet* 8:e1002621 doi:10.1371/journal.pgen.1002621
- Chewning JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B (2007) KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro *J Immunol* 179:854-868 doi:179/2/854 [pii]
- Christiansen FT, Gaudieri, S., De Santis, D., Witt, C.S., James, I.R., Mallal, S. (2002) NK receptor genes are predictors of HIV progression. Paper presented at the 28th Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Nashville, TN, 19-23 October 2002
- Dean M et al. (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study *Science* 273:1856-1862
- Dean M et al. (1999) Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the *CCR5*-delta32 mutation *Cancer research* 59:3561-3564
- Desbois M, Rusakiewicz S, Locher C, Zitvogel L, Chaput N (2012) Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies *Frontiers in immunology* 3:395 doi:10.3389/fimmu.2012.00395

- Diefenbach A, Raulet DH (2001) Strategies for target cell recognition by natural killer cells *Immunol Rev* 181:170-184
- Dohring C, Samaridis J, Colonna M (1996a) Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors *Immunogenetics* 44:227-230
- Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M (1996b) A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2 *J Immunol* 156:3098-3101
- Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy *Nature reviews Cancer* 4:11-22 doi:10.1038/nrc1252
- Du Z, Sharma SK, Spellman S, Reed EF, Rajalingam R (2008) KIR2DL5 alleles mark certain combination of activating KIR genes *Genes Immun* 9:470-480 doi:10.1038/gene.2008.39
- Duggal P et al. (2003) Genetic influence of CXCR6 chemokine receptor alleles on PCP-mediated AIDS progression among African Americans *Genes Immun* 4:245-250 doi:10.1038/sj.gene.6363950
- Eyzaguirre L et al. (2007) First molecular surveillance report of HIV type 1 in injecting drug users and female sex workers along the U.S.-Mexico border *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:331-334 doi:10.1089/aid.2006.0166
- Falk CS, Steinle A, Schendel DJ (1995) Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to allospecific natural killer cells *J Exp Med* 182:1005-1018
- 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
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles *Molecular ecology notes* 7:574-578 doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Fauquete (2005) *Virus Taxonomy VIII, Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press,
- Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT (2010) Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition *Blood* 115:2167-2176 doi:10.1182/blood-2009-08-238469
- Fellay J et al. (2009) Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans *PLoS Genet* 5:e1000791 doi:10.1371/journal.pgen.1000791
- Fellay J et al. (2007) A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1 *Science* 317:944-947 doi:1143767 [pii] 10.1126/science.1143767
- Ferlazzo G, Munz C (2004) NK cell compartments and their activation by dendritic cells *J Immunol* 172:1333-1339
- Flores-Villanueva PO et al. (2003) Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance/susceptibility to AIDS disease development *J Immunol* 170:1925-1929
- Flores-Villanueva PO et al. (2001) Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5140-5145 doi:10.1073/pnas.071548198 071548198 [pii]
- Frange P et al. (2008) New and old complex recombinant HIV-1 strains among patients with primary infection in 1996-2006 in France: the French ANRS CO06 primo cohort study *Retrovirology* 5:69 doi:10.1186/1742-4690-5-69

- Frazer KA et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs *Nature* 449:851-861 doi:10.1038/nature06258
- Galandrini R, Tassi I, Mattia G, Lenti L, Piccoli M, Frati L, Santoni A (2002) SH2-containing inositol phosphatase (SHIP-1) transiently translocates to raft domains and modulates CD16-mediated cytotoxicity in human NK cells *Blood* 100:4581-4589 doi:10.1182/blood-2002-04-1058
- Gao X et al. (2001) Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS *The New England journal of medicine* 344:1668-1675 doi:10.1056/NEJM200105313442203
- Gaudieri S et al. (2005) Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression *Genes Immun* 6:683-690 doi:6364256 [pii] 10.1038/sj.gene.6364256
- Gazit R et al. (2004) Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome *Blood* 103:1965-1966 doi:10.1182/blood-2003-11-3796
- Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, Graef T, Moesta AK, Layrisse Z, Parham P (2009) Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18692-18697 doi:10.1073/pnas.0906051106
- Geretti AM (2006) HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management *Current opinion in infectious diseases* 19:1-7
- Gerhard P (1986) Geografía Histórica de la Nueva España, 1519-1821. In: México UNAd (ed) *Espacio y Tiempo* 1. Universidad Nacional Autónoma de México, México, p 498
- Gonzalez-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 acids research* 39:D913-919 doi:10.1093/nar/gkq1128
- Gorodezky C et al. (2001) The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites *Hum Immunol* 62:979-991
- Goulder PJ, Watkins DI (2008) Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication *Nature reviews Immunology* 8:619-630 doi:10.1038/nri2357
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ (2006) Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys *Nature medicine* 12:289-295 doi:10.1038/nm1380
- Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P (1995) The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor *J Exp Med* 181:1133-1144
- Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, Lanier LL, Tyan D (1996) Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype *J Exp Med* 183:1817-1827
- Hansen DS, D'Ombra MC, Schofield L (2007) The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria *Current opinion in immunology* 19:416-423 doi:10.1016/j.coi.2007.07.011

- Harel-Bellan A, Quillet A, Marchiol C, DeMars R, Tursz T, Fradelizi D (1986) Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6 *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5688-5692
- Hemelaar J (2013) Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic *The Journal of infection* 66:391-400 doi:10.1016/j.jinf.2012.10.026
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S (2006) Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004 *AIDS* 20:W13-23 doi:10.1097/01.aids.0000247564.73009.bc
- Henkart PA (1985) Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity *Annu Rev Immunol* 3:31-58 doi:10.1146/annurev.iy.03.040185.000335
- Hernandez-Ramirez D, Esparza-Perez MA, Ramirez-Garcialuna JL, Arguello JR, Mandeville PB, Noyola DE, Garcia-Sepulveda CA (2015) Association of KIR3DL1/S1 and HLA-Bw4 with CD4 T cell counts in HIV-infected Mexican mestizos *Immunogenetics* doi:10.1007/s00251-015-0848-z
- HGNC HUGO Gene Nomenclature Committee.
www.genenames.org/genefamilies/KIR.
- Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Stahle M, Sanchez FO (2005) Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis *The Journal of investigative dermatology* 125:721-730 doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23879.x
- Hollenbach JA et al. (2010) Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA Tissue Antigens 76:9-17 doi:TAN1459 [pii] 10.1111/j.1399-0039.2010.01459.x
- Hollenbach JA, Necedal I, Ladner MB, Single RM, Trachtenberg EA (2012) Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene content variation in the HGDP-CEPH populations *Immunogenetics* 64:719-737 doi:10.1007/s00251-012-0629-x
- Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B (2002) The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism *Immunol Rev* 190:40-52
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information *Molecular ecology resources* 9:1322-1332 doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- Huntington ND et al. (2009) IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo *J Exp Med* 206:25-34 doi:10.1084/jem.20082013
- Husain Z, Alper CA, Yunis EJ, Dubey DP (2002) Complex expression of natural killer receptor genes in single natural killer cells *Immunology* 106:373-380
- Iannello A, Debbeche O, Samarani S, Ahmad A (2008) Antiviral NK cell responses in HIV infection: I. NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS *J Leukoc Biol* 84:1-26 doi:jlb.0907650 [pii] 10.1189/jlb.0907650
- Im HK, Gamazon ER, Stark AL, Huang RS, Cox NJ, Dolan ME (2012) Mixed effects modeling of proliferation rates in cell-based models: consequence for pharmacogenomics and cancer *PLoS Genet* 8:e1002525 doi:10.1371/journal.pgen.1002525
- IPD-IMGT/HLA. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/ethnicity.html>. Accessed April, 2016

- Itescu S, Mathur-Wagh U, Skovron ML, Brancato LJ, Marmor M, Zeleniuch-Jacquotte A, Winchester R (1992) HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS *J Acquir Immune Defic Syndr* 5:37-45
- Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Adje-Toure CA, Vuylsteke B, Nkengasong JN, Kestens L (2006) Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands *J Immunol* 177:6588-6592 doi:177/10/6588 [pii]
- Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Menten J, Vuylsteke B, Nkengasong JN, Kestens L Low CD4+ T Cell Counts among African HIV-1 Infected Subjects with Group B KIR Haplotypes in the Absence of Specific Inhibitory KIR Ligands *PLoS One* 6:e17043 doi:10.1371/journal.pone.0017043
- Juelke K et al. (2010) CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells *Blood* 116:1299-1307 doi:10.1182/blood-2009-11-253286
- Karim R et al. (2013) Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach *AIDS* 27:1473-1481 doi:10.1097/QAD.0b013e3283601bad
- Karlsen TH et al. (2007) Particular genetic variants of ligands for natural killer cell receptors may contribute to the HLA associated risk of primary sclerosing cholangitis *Journal of hepatology* 46:899-906 doi:10.1016/j.jhep.2007.01.032
- Kaslow RA et al. (1996) Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection *Nature medicine* 2:405-411
- Kaslow RA et al. (1990) A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study *Lancet* 335:927-930
- Kayagaki N et al. (1999) Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells *J Immunol* 163:1906-1913
- Khakoo SI, Carrington M (2006) KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 214:186-201 doi:IMR459 [pii] 10.1111/j.1600-065X.2006.00459.x
- Khakoo SI et al. (2000) Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans *Immunity* 12:687-698
- Khakoo SI et al. (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection *Science* 305:872-874 doi:10.1126/science.1097670 305/5685/872 [pii]
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H (1975) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype *Eur J Immunol* 5:112-117 doi:10.1002/eji.1830050208
- Kitawaki J et al. (2007) Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with susceptibility to endometriosis *Am J Reprod Immunol* 58:481-486 doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00533.x
- Kozak M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes *Cell* 44:283-292
- Kuritzkes DR, Walker, B.D. (2007a) HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations and Treatment. In: Knipe DM H, PM (ed) *Fields Virology*, vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 2187-2214
- Kuritzkes DR, Walker, B.D. (2007b) HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations and Treatment. In: *Fields Virology*, vol 2. Fifth edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia,

- Lal RB, Chakrabarti S, Yang C (2005) Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development *The Indian journal of medical research* 121:287-314
- Lanier LL (1998) NK cell receptors *Annu Rev Immunol* 16:359-393 doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.359
- Lanier LL (2001) On guard--activating NK cell receptors *Nat Immunol* 2:23-27 doi:10.1038/83130
- Lanier LL (2005) NK cell recognition *Annu Rev Immunol* 23:225-274 doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526
- Lanier LL (2008) Evolutionary struggles between NK cells and viruses *Nature reviews Immunology* 8:259-268 doi:10.1038/nri2276
- Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH (1998) Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells *Nature* 391:703-707 doi:10.1038/35642
- Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Jr., Tutt M, Kumar V (1986) Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function *J Immunol* 137:2735-2739
- Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, Geraghty DE (1998) HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5199-5204
- Levinson RD et al. (2008) Combination of KIR and HLA gene variants augments the risk of developing birdshot chorioretinopathy in HLA-A*29-positive individuals *Genes Immun* 9:249-258 doi:10.1038/gene.2008.13
- Lichterfeld M, Yu XG (2012) The emerging role of leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) in HIV-1 infection *J Leukoc Biol* 91:27-33 doi:10.1189/jlb.0811442
- Lin A, Xu H, Yan W (2007) Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion *Cellular & molecular immunology* 4:91-98
- Listgarten J et al. (2008) Statistical resolution of ambiguous HLA typing data *PLoS computational biology* 4:e1000016 doi:10.1371/journal.pcbi.1000016
- Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, Nixon DF, Barbour JD (2008) Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection *J Virol* 82:4785-4792 doi:10.1128/JVI.02449-07
- Long EO, Rajagopalan S (2000) HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors *Seminars in immunology* 12:101-108 doi:10.1006/smim.2000.0212
- Lopez-Vazquez A et al. (2005) Interaction between KIR3DL1 and HLA-B*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population *Hum Immunol* 66:285-289 doi:10.1016/j.humimm.2005.01.001
- Lopez-Verges S et al. (2010) CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset *Blood* 116:3865-3874 doi:10.1182/blood-2010-04-282301
- Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM (2004) Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection *Nature medicine* 10:1359-1365 doi:10.1038/nm1147
- Luszczek W, Manczak M, Cislo M, Nockowski P, Wisniewski A, Jasek M, Kusnierczyk P (2004) Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris *Hum Immunol* 65:758-766 doi:10.1016/j.humimm.2004.05.008
- Magis-Rodriguez CH-Á, M. (2008) Epidemiología del SIDA en México. In: Córdoba-Villalobos J, Ponce de León-Rosales, S., Valdespino, J. (ed) 25 Años de SIDA

- en México Logros, desaciertos y retos. Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México, pp 85-103
- Majorczyk E, Pawlik A, Luszczek W, Nowak I, Wisniewski A, Jasek M, Kusnierczyk P (2007) Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis *Genes Immun* 8:678-683 doi:10.1038/sj.gene.6364433
- Markowitz M et al. (2005) Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report *Lancet* 365:1031-1038 doi:10.1016/S0140-6736(05)71139-9
- Marsh SG et al. (2003) Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002 *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* 30:229-234
- Martin MP et al. (1998) Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5 *Science* 282:1907-1911
- Martin MP et al. (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS *Nat Genet* 31:429-434 doi:10.1038/ng934
ng934 [pii]
- Martin MP et al. (2007) Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1 *Nat Genet* 39:733-740 doi:ng2035 [pii]
10.1038/ng2035
- Martinez-Marignac VL et al. (2007) Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors *Hum Genet* 120:807-819 doi:10.1007/s00439-006-0273-3
- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M (2005) Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection *Nature* 434:1093-1097 doi:10.1038/nature03501
- Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD (2002) A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey *Tissue Antigens* 60:254-258
- McVicar DW et al. (1998) DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase *The Journal of biological chemistry* 273:32934-32942
- Mendez A et al. (2006) Study of KIR genes in tuberculosis patients *Tissue Antigens* 68:386-389 doi:10.1111/j.1399-0039.2006.00685.x
- Middleton D, Halfpenny I, Meenagh A, Williams F, Sivula J, Tuomilehto-Wolf E (2006) Investigation of KIR gene frequencies in type 1 diabetes mellitus *Hum Immunol* 67:986-990 doi:10.1016/j.humimm.2006.08.295
- Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R (2003) New allele frequency database: <http://www.allelefrequencys.net> *Tissue Antigens* 61:403-407
- Mingari MC et al. (1997) HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells *Int Immunol* 9:485-491
- Mingari MC, Ponte M, Vitale C, Bellomo R, Moretta L (2000) Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function *Hum Immunol* 61:44-50
- Modi WS et al. (2003) MCP-1-MCP-3-Eotaxin gene cluster influences HIV-1 transmission *AIDS* 17:2357-2365 doi:10.1097/01.aids.0000076359.20434.44

- Momot T, Koch S, Hunzelmann N, Krieg T, Ulbricht K, Schmidt RE, Witte T (2004) Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma Arthritis and rheumatism 50:1561-1565 doi:10.1002/art.20216
- Moreno-Estrada A et al. (2014) Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits Science 344:1280-1285 doi:10.1126/science.1251688
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L (1996) Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells Annu Rev Immunol 14:619-648 doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.619
- Moretta A et al. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity Annu Rev Immunol 19:197-223 doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.197
- Moretta A et al. (1990) A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function J Exp Med 171:695-714
- Morgan D, Mahe C, Mayanja B, Okongo JM, Lubega R, Whitworth JA (2002) HIV-1 infection in rural Africa: is there a difference in median time to AIDS and survival compared with that in industrialized countries? AIDS 16:597-603
- Muller CA, Engler-Blum G, Gekeler V, Steiert I, Weiss E, Schmidt H (1989) Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6 Immunogenetics 30:200-207
- Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, Goronzy JJ (2000) Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis J Immunol 165:1138-1145
- Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M (2004) Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis J Immunol 173:4273-4276
- Nemat-Gorgani N et al. (2014) KIR diversity in Maori and Polynesians: populations in which HLA-B is not a significant KIR ligand Immunogenetics 66:597-611 doi:10.1007/s00251-014-0794-1
- Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW (2001) Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups Immunogenetics 52:195-205
- Nuno-Arana I et al. (2012) Distribution of three SNPs related to low bone mineral density in Amerindian groups and Mestizos from Mexico American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council 24:569-572 doi:10.1002/ajhb.22262
- O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM (2007) Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells J Immunol 178:235-241 doi:10.1093/immk/178/1/235 [pii]
- Paolini R, Molfetta R, Piccoli M, Frati L, Santoni A (2001) Ubiquitination and degradation of Syk and ZAP-70 protein tyrosine kinases in human NK cells upon CD16 engagement Proc Natl Acad Sci U S A 98:9611-9616 doi:10.1073/pnas.161298098
- Pelak K et al. (2011) Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control PLoS biology 9:e1001208 doi:10.1371/journal.pbio.1001208
- Pende D et al. (1996) The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized

- by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer *J Exp Med* 184:505-518
- Pereyra F et al. (2010) The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation *Science* 330:1551-1557 doi:10.1126/science.1195271
- Pietra G, Semino C, Cagnoni F, Boni L, Cangemi G, Frumento G, Melioli G (2000) Natural killer cells lyse autologous herpes simplex virus infected targets using cytolytic mechanisms distributed clonotypically *Journal of medical virology* 62:354-363
- Ponte M et al. (1999) Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5674-5679
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data *Genetics* 155:945-959
- Purcell S et al. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses *American journal of human genetics* 81:559-575 doi:10.1086/519795
- Pyne MT, Hackett J, Jr., Holzmayer V, Hillyard DR (2013) Large-scale analysis of the prevalence and geographic distribution of HIV-1 non-B variants in the United States *Journal of clinical microbiology* 51:2662-2669 doi:10.1128/JCM.00880-13
- Qi Y et al. (2006) KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections *PLoS Pathog* 2:e79 doi:06-PLPA-RA-0142R2 [pii] 10.1371/journal.ppat.0020079
- Rajagopalan S, Long EO (1999) A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells *J Exp Med* 189:1093-1100
- Rangel-Villalobos H, Munoz-Valle JF, Gonzalez-Martin A, Gorostiza A, Magana MT, Paez-Riberos LA (2008) Genetic admixture, relatedness, and structure patterns among Mexican populations revealed by the Y-chromosome *American journal of physical anthropology* 135:448-461 doi:10.1002/ajpa.20765
- Raulet DH (2003) Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands *Nature reviews Immunology* 3:781-790 doi:10.1038/nri1199
- Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H (2013) Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor *Annu Rev Immunol* 31:413-441 doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095951
- Raulet DH, Held W, Correa I, Dorfman JR, Wu MF, Corral L (1997) Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors *Immunol Rev* 155:41-52
- Raulet DH, Vance RE (2006) Self-tolerance of natural killer cells *Nature reviews Immunology* 6:520-531 doi:10.1038/nri1863
- Raulet DH, Vance RE, McMahon CW (2001) Regulation of the natural killer cell receptor repertoire *Annu Rev Immunol* 19:291-330 doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.291
- Ravetch JV, Lanier LL (2000) Immune inhibitory receptors *Science* 290:84-89
- Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, Albin JS, Brown WL, Harris RS (2010) Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction *Nucleic acids research* 38:4274-4284 doi:10.1093/nar/gkq174

- Richardson J, Reyburn HT, Luque I, Vales-Gomez M, Strominger JL (2000) Definition of polymorphic residues on killer Ig-like receptor proteins which contribute to the HLA-C binding site *Eur J Immunol* 30:1480-1485 doi:10.1002/(SICI)1521-4141(200005)30:5<1480::AID-IMMU1480>3.0.CO;2-7
- Rivera-Morales LG et al. (2001) The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:87-92 doi:10.1089/088922201750056825
- Roetynck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S (2006) Natural killer cells and malaria *Immunol Rev* 214:251-263 doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00446.x
- Romagnani C et al. (2007) CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation *J Immunol* 178:4947-4955
- Romero V et al. (2008) Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome *Mol Immunol* 45:2429-2436 doi:10.1016/j.molimm.2008.01.002
- Ross SR (2009) Are viruses inhibited by APOBEC3 molecules from their host species? *PLoS Pathog* 5:e1000347 doi:10.1371/journal.ppat.1000347
- Ruiz-Linares A et al. (2014) Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals *PLoS Genet* 10:e1004572 doi:10.1371/journal.pgen.1004572
- Russell JH, Ley TJ (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity *Annu Rev Immunol* 20:323-370 doi:10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730
- Salim PH, Jobim M, Jobim LF, Xavier RM (2011) Autoimmune rheumatic diseases and their association with killer immunoglobulin-like receptor genes *Revista brasileira de reumatologia* 51:351-356, 362-354
- Sanchez MA, Lemp GF, Magis-Rodriguez C, Bravo-Garcia E, Carter S, Ruiz JD (2004) The epidemiology of HIV among Mexican migrants and recent immigrants in California and Mexico *J Acquir Immune Defic Syndr* 37 Suppl 4:S204-214
- Sawicki MW, Dimasi N, Natarajan K, Wang J, Margulies DH, Mariuzza RA (2001) Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors *Immunol Rev* 181:52-65
- Selvakumar A, Steffens U, Dupont B (1996) NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains *Tissue Antigens* 48:285-294
- Selvakumar A, Steffens U, Dupont B (1997) Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors *Immunol Rev* 155:183-196
- Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D, Parham P (2002a) Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype *J Immunol* 168:2307-2315
- Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, Parham P (2002b) Genetic control of human NK cell repertoire *J Immunol* 169:239-247
- Silva-Zolezzi I et al. (2009) Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8611-8616 doi:10.1073/pnas.0903045106
- Smith MW et al. (1997) Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study *Science* 277:959-965

- Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H (2002) New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer *Nature reviews Cancer* 2:850-861 doi:10.1038/nrc928
- Stavenhagen R, Carrasco, T. (1997) La diversidad étnica y cultural. In: Artes CNplCyl (ed) *El Patrimonio Nacional de México*, vol 1. pp 249-280
- Storey JD (2002) A direct approach to false discovery rates *JR Stat Soc B* 64:479-498
- Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T, Muto M (2004) Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris *The Journal of investigative dermatology* 122:1133-1136 doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22517.x
- Tang J et al. (1999) HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:317-324 doi:10.1089/088922299311277
- Thomas R et al. (2009) HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C *Nat Genet* 41:1290-1294 doi:10.1038/ng.486
- Tiemessen CT et al. (2011) Natural killer cell responses to HIV-1 peptides are associated with more activating KIR genes and HLA-C genes of the C1 allotype *J Acquir Immune Defic Syndr* 57:181-189 doi:10.1097/QAI.0b013e3182174a76
- Torkar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ (1998) Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex *Eur J Immunol* 28:3959-3967 doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199812)28:12<3959::AID-IMMU3959>3.0.CO;2-2
- Trowsdale J (2001) Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes *Immunity* 15:363-374
- Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ (2001) The genomic context of natural killer receptor extended gene families *Immunol Rev* 181:20-38
- Uhrberg M et al. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes *Immunity* 7:753-763 doi:S1074-7613(00)80394-5 [pii]
- Uhrberg M, Valiante NM, Young NT, Lanier LL, Phillips JH, Parham P (2001) The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns *J Immunol* 166:3923-3932
- UNAIDS AIDSinfo. UNAIDS. <http://aidsinfo.unaids.org/>. Accessed 27/05/2016 2016
- UNAIDS (2012) Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2012. http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/20121120_globalreport2012/.
- Valiante NM et al. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors *Immunity* 7:739-751
- van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ (2003) KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects *Diabetes* 52:2639-2642
- van Manen D, Rits MA, Beugeling C, van Dort K, Schuitemaker H, Kootstra NA (2008) The effect of Trim5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection *PLoS Pathog* 4:e18 doi:10.1371/journal.ppat.0040018
- Vance RE, Kraft JR, Altman JD, Jensen PE, Raulet DH (1998) Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b) *J Exp Med* 188:1841-1848

- Vilches C, Gardiner CM, Parham P (2000a) Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene *J Immunol* 165:6416-6421
- Vilches C, Pando MJ, Parham P (2000b) Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain *Immunogenetics* 51:639-646
- Vilches C, Parham P (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity *Annu Rev Immunol* 20:217-251 doi:10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942
- Vilches C, Rajalingam R, Uhrberg M, Gardiner CM, Young NT, Parham P (2000c) KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains *J Immunol* 164:5797-5804
- Vivier E et al. (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells *Science* 331:44-49 doi:331/6013/44 [pii] 10.1126/science.1198687
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells *Nat Immunol* 9:503-510 doi:10.1038/ni1582
- Wagtmann N et al. (1995) Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains *Immunity* 2:439-449
- Wang S et al. (2008) Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos *PLoS Genet* 4:e1000037 doi:10.1371/journal.pgen.1000037
- Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A (1999) Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4 Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society 10:154-160
- Wende H, Volz A, Ziegler A (2000) Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster *Immunogenetics* 51:703-713
- WHO Global HIV/AIDS Response: Epidemic update and health sector progress towards Universal Access. http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/index.html.
- Wilson MJ et al. (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4778-4783 doi:10.1073/pnas.080588597
- Wilson MJ, Torkar M, Trowsdale J (1997) Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene *Tissue Antigens* 49:574-579
- Williams AL et al. (2014) Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico *Nature* 506:97-101 doi:10.1038/nature12828
- Williams F et al. (2001) Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents *Hum Immunol* 62:645-650
- Winkler C et al. (1998) Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC) *Science* 279:389-393
- Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N (1998) Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition *J Immunol* 161:571-577
- Winter CC, Long EO (1997) A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes *J Immunol* 158:4026-4028

- Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT (1999) Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination Transplantation 68:1784-1789
- Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ (2001) Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis J Exp Med 193:1159-1167
- Yokoyama WM, Kim S (2006) Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I Immunol Rev 214:143-154 doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x
- Yokoyama WM, Kim S, French AR (2004) The dynamic life of natural killer cells Annu Rev Immunol 22:405-429 doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104711
- Yokoyama WM, Seaman WE (1993) The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex Annu Rev Immunol 11:613-635 doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.003145
- Yu J et al. (2010) CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets Blood 115:274-281 doi:10.1182/blood-2009-04-215491
- Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B (1998) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells J Exp Med 188:2375-2380

Anexos

Anexo 1. Marcadores informativos de Ancestría (AIMs)

| SNP rsID | chr | position | A1 | A2 | NAM_AF | EUR_AF | AFR_AF | population | LSBL (Fst) | LSBL(ln) |
|------------|-----|-----------|----|----|--------|--------|--------|------------|------------|----------|
| rs6685064 | 1 | 1201155 | C | T | 0.244 | 0.93 | 0.422 | EUR | 0.372 | 0.209 |
| rs6684063 | 1 | 30471927 | T | G | 0.183 | 0.841 | 0.218 | EUR | 0.411 | 0.223 |
| rs2984915 | 1 | 59026283 | T | C | 0.011 | 0.09 | 0.853 | AFR | 0.636 | 0.378 |
| rs12727814 | 1 | 71786781 | G | A | 0.057 | 0.752 | 0.078 | EUR | 0.484 | 0.273 |
| rs12021830 | 1 | 119363905 | T | C | 0.107 | 0.838 | 0.995 | NAM | 0.626 | 0.376 |
| rs6693833 | 1 | 160209682 | C | T | 0.229 | 0.772 | 0.053 | EUR | 0.382 | 0.213 |
| rs7527770 | 1 | 246293824 | A | C | 0.019 | 0.173 | 0.941 | AFR | 0.69 | 0.419 |
| rs798364 | 2 | 16762671 | A | G | 0.008 | 0.192 | 0.927 | AFR | 0.652 | 0.396 |
| rs2710684 | 2 | 17677511 | C | T | 0.065 | 0.783 | 0.854 | NAM | 0.573 | 0.329 |
| rs11124754 | 2 | 40729617 | T | C | 0.213 | 0.919 | 0.296 | EUR | 0.452 | 0.252 |
| rs4643526 | 2 | 61038155 | A | G | 0.019 | 0.177 | 0.917 | AFR | 0.646 | 0.387 |
| rs7584385 | 2 | 69094763 | A | G | 0.206 | 0.806 | 0.078 | EUR | 0.432 | 0.24 |
| rs10496176 | 2 | 70027133 | T | C | 0.061 | 0.821 | 0.835 | NAM | 0.595 | 0.342 |
| rs260690 | 2 | 108946170 | A | C | 0.078 | 0.935 | 0.384 | EUR | 0.47 | 0.277 |
| rs10497191 | 2 | 158375463 | T | C | 0.115 | 0.151 | 0.951 | AFR | 0.674 | 0.397 |
| rs6759814 | 2 | 163101007 | T | C | 0.263 | 0.945 | 0.296 | EUR | 0.466 | 0.265 |
| rs2044770 | 2 | 174892151 | A | G | 0.076 | 0.824 | 0.971 | NAM | 0.654 | 0.39 |
| rs7568054 | 2 | 190206141 | G | A | 0.053 | 0.651 | 0.005 | EUR | 0.422 | 0.251 |
| rs10186877 | 2 | 216327063 | C | G | 0.103 | 0.709 | 0.058 | EUR | 0.41 | 0.229 |

| | | | | | | | | | | |
|------------|---|-----------|---|---|-------|-------|-------|-----|-------|-------|
| rs1472714 | 3 | 1067542 | G | A | 0.027 | 0.614 | 0.04 | EUR | 0.385 | 0.223 |
| rs4109078 | 3 | 3215356 | T | C | 0.111 | 0.858 | 0.903 | NAM | 0.591 | 0.336 |
| rs9863982 | 3 | 31509158 | C | T | 0.008 | 0.234 | 0.942 | AFR | 0.636 | 0.39 |
| rs4955903 | 3 | 54884236 | T | C | 0.023 | 0.647 | 0.956 | NAM | 0.579 | 0.362 |
| rs862500 | 3 | 64247689 | A | T | 0.134 | 0.821 | 0.117 | EUR | 0.485 | 0.268 |
| rs2317212 | 3 | 98810974 | G | T | 0.073 | 0.878 | 0.34 | EUR | 0.422 | 0.24 |
| rs6791346 | 3 | 124245130 | T | C | 0 | 0.151 | 0.917 | AFR | 0.678 | 0.414 |
| rs1586861 | 3 | 140541186 | T | C | 0.046 | 0.899 | 0.863 | NAM | 0.7 | 0.415 |
| rs2106124 | 3 | 170540703 | G | A | 0.031 | 0.739 | 0.155 | EUR | 0.414 | 0.235 |
| rs11725412 | 4 | 37954149 | G | A | 0.05 | 0.931 | 0.816 | NAM | 0.672 | 0.4 |
| rs10026397 | 4 | 41260644 | A | G | 0.046 | 0.194 | 0.932 | AFR | 0.643 | 0.381 |
| rs1486498 | 4 | 61554674 | C | T | 0.031 | 0.561 | 0.024 | EUR | 0.342 | 0.2 |
| rs920559 | 4 | 102437738 | C | G | 0.275 | 0.856 | 0.211 | EUR | 0.378 | 0.205 |
| rs17015014 | 4 | 142948222 | G | C | 0.115 | 0.869 | 0.947 | NAM | 0.623 | 0.36 |
| rs1391099 | 4 | 143593360 | A | G | 0.174 | 0.848 | 0.291 | EUR | 0.376 | 0.204 |
| rs6835367 | 4 | 151729289 | T | C | 0.008 | 0.104 | 0.884 | AFR | 0.67 | 0.402 |
| rs10071261 | 5 | 1066694 | T | C | 0.107 | 0.086 | 0.903 | AFR | 0.65 | 0.375 |
| rs10042283 | 5 | 15968161 | T | G | 0.069 | 0.663 | 0.044 | EUR | 0.399 | 0.226 |
| rs353373 | 5 | 40261722 | G | A | 0.191 | 0.863 | 1 | NAM | 0.53 | 0.315 |
| rs17157450 | 5 | 104384818 | C | T | 0.145 | 0.864 | 0.903 | NAM | 0.544 | 0.305 |
| rs13354224 | 5 | 108848634 | C | T | 0.008 | 0.111 | 0.903 | AFR | 0.693 | 0.419 |
| rs2227282 | 5 | 132041078 | G | C | 0.103 | 0.73 | 0.005 | EUR | 0.461 | 0.271 |
| rs2042314 | 5 | 170110158 | G | A | 0.061 | 0.86 | 0.854 | NAM | 0.638 | 0.37 |
| rs860747 | 6 | 14808928 | A | G | 0.008 | 0.152 | 0.937 | AFR | 0.709 | 0.434 |
| rs2754777 | 6 | 24898441 | A | C | 0.027 | 0.516 | 0.005 | EUR | 0.317 | 0.192 |
| rs10498810 | 6 | 56234862 | C | A | 0.079 | 0.887 | 0.947 | NAM | 0.698 | 0.411 |
| rs1325476 | 6 | 84598672 | T | C | 0.424 | 0.921 | 0.165 | EUR | 0.388 | 0.22 |
| rs7752055 | 6 | 106067405 | C | T | 0.038 | 0.119 | 0.893 | AFR | 0.656 | 0.384 |
| rs9384878 | 6 | 114081811 | C | T | 0.015 | 0.649 | 0.848 | NAM | 0.553 | 0.338 |
| rs218862 | 6 | 121425761 | C | T | 0.153 | 0.837 | 0.097 | EUR | 0.506 | 0.282 |
| rs6605534 | 6 | 169464466 | G | A | 0.058 | 0.855 | 0.874 | NAM | 0.654 | 0.381 |
| rs2080161 | 7 | 13297675 | A | C | 0.099 | 0.798 | 0.976 | NAM | 0.593 | 0.351 |
| rs7808899 | 7 | 14779699 | T | G | 0.298 | 0.83 | 0.146 | EUR | 0.362 | 0.197 |
| rs7794503 | 7 | 31015423 | C | T | 0.008 | 0.228 | 0.961 | AFR | 0.675 | 0.42 |
| rs259162 | 7 | 89466838 | A | C | 0.127 | 0.696 | 0.113 | EUR | 0.344 | 0.186 |
| rs2384982 | 7 | 103493636 | C | T | 0.187 | 0.938 | 0.398 | EUR | 0.424 | 0.242 |
| rs10258063 | 7 | 131478822 | A | G | 0.004 | 0.075 | 0.917 | AFR | 0.758 | 0.466 |
| rs17150066 | 8 | 9347921 | G | A | 0.088 | 0.858 | 0.985 | NAM | 0.674 | 0.405 |
| rs11778591 | 8 | 12764720 | A | C | 0.057 | 0.908 | 0.418 | EUR | 0.407 | 0.238 |
| rs1436612 | 8 | 35648583 | C | G | 0.011 | 0.178 | 0.898 | AFR | 0.617 | 0.368 |
| rs569688 | 8 | 61124375 | C | A | 0.096 | 0.811 | 0.917 | NAM | 0.583 | 0.334 |
| rs956969 | 8 | 62227592 | T | C | 0.034 | 0.623 | 0.049 | EUR | 0.381 | 0.218 |
| rs16880715 | 8 | 111524781 | T | G | 0.019 | 0.091 | 0.859 | AFR | 0.641 | 0.379 |

| | | | | | | | | | | |
|------------|----|-----------|---|---|-------|-------|-------|-----|-------|-------|
| rs799889 | 8 | 117320076 | T | G | 0.103 | 0.83 | 0.113 | EUR | 0.524 | 0.292 |
| rs1500318 | 9 | 8351445 | T | C | 0.015 | 0.137 | 0.854 | AFR | 0.589 | 0.347 |
| rs10811305 | 9 | 20047787 | G | C | 0.062 | 0.85 | 0.976 | NAM | 0.706 | 0.427 |
| rs7864029 | 9 | 21920147 | G | C | 0.242 | 0.824 | 0.17 | EUR | 0.38 | 0.205 |
| rs7851160 | 9 | 79438617 | A | G | 0.191 | 0.837 | 0.172 | EUR | 0.43 | 0.234 |
| rs2809393 | 9 | 119931458 | C | T | 0.103 | 0.867 | 0.35 | EUR | 0.389 | 0.218 |
| rs10751867 | 10 | 2339064 | T | C | 0.351 | 0.916 | 0.175 | EUR | 0.429 | 0.241 |
| rs3123687 | 10 | 31569267 | C | G | 0.027 | 0.072 | 0.966 | AFR | 0.835 | 0.52 |
| rs3810947 | 10 | 50491249 | G | A | 0.202 | 0.946 | 0.378 | EUR | 0.445 | 0.255 |
| rs7911953 | 10 | 61461045 | T | G | 0.157 | 0.906 | 0.884 | NAM | 0.546 | 0.307 |
| rs7097617 | 10 | 77174293 | G | A | 0.076 | 0.194 | 0.966 | AFR | 0.687 | 0.414 |
| rs7902158 | 10 | 83713437 | A | G | 0.047 | 0.763 | 0.039 | EUR | 0.539 | 0.312 |
| rs17130385 | 10 | 115186009 | G | T | 0.109 | 0.933 | 0.971 | NAM | 0.71 | 0.423 |
| rs9422913 | 10 | 127335597 | C | T | 0.771 | 0.118 | 0.718 | EUR | 0.399 | 0.218 |
| rs874189 | 11 | 15838275 | A | G | 0.023 | 0.689 | 0.107 | EUR | 0.405 | 0.232 |
| rs174570 | 11 | 61353788 | C | T | 0.031 | 0.88 | 0.99 | NAM | 0.799 | 0.502 |
| rs1790740 | 11 | 66886698 | T | C | 0.225 | 0.929 | 0.17 | EUR | 0.542 | 0.308 |
| rs568789 | 11 | 83823790 | T | C | 0.076 | 0.242 | 0.995 | AFR | 0.7 | 0.443 |
| rs7103088 | 11 | 129514516 | A | G | 0.019 | 0.111 | 0.917 | AFR | 0.713 | 0.429 |
| rs4937920 | 11 | 133970954 | C | T | 0.195 | 0.915 | 0.995 | NAM | 0.576 | 0.343 |
| rs10848765 | 12 | 3011756 | C | T | 0.011 | 0.241 | 0.961 | AFR | 0.662 | 0.411 |
| rs7961436 | 12 | 10134132 | G | A | 0.057 | 0.64 | 0.084 | EUR | 0.353 | 0.196 |
| rs11048128 | 12 | 25659380 | G | C | 0.023 | 0.774 | 0.799 | NAM | 0.605 | 0.361 |
| rs1486341 | 12 | 37328330 | C | A | 0.298 | 0.852 | 0.044 | EUR | 0.43 | 0.247 |
| rs3759171 | 12 | 70593883 | A | G | 0.034 | 0.732 | 0.015 | EUR | 0.53 | 0.315 |
| rs10732643 | 12 | 87686246 | T | G | 0.011 | 0.07 | 0.879 | AFR | 0.698 | 0.42 |
| rs10774871 | 12 | 115467105 | A | G | 0.244 | 0.912 | 0.33 | EUR | 0.403 | 0.223 |
| rs2585897 | 13 | 20296979 | G | A | 0.076 | 0.857 | 0.884 | NAM | 0.631 | 0.364 |
| rs7990216 | 13 | 24798838 | T | C | 0.271 | 0.898 | 0.083 | EUR | 0.504 | 0.288 |
| rs2151236 | 13 | 40667660 | T | A | 0.085 | 0.148 | 0.976 | AFR | 0.741 | 0.451 |
| rs9523747 | 13 | 92095202 | A | T | 0.031 | 0.773 | 0.206 | EUR | 0.411 | 0.234 |
| rs11625446 | 14 | 47314308 | C | A | 0.043 | 0.769 | 0.922 | NAM | 0.638 | 0.38 |
| rs2251244 | 14 | 61093017 | C | A | 0.717 | 0.181 | 0.985 | EUR | 0.407 | 0.237 |
| rs12435594 | 14 | 68625619 | G | C | 0.073 | 0.705 | 0.937 | NAM | 0.538 | 0.316 |
| rs7142344 | 14 | 78319897 | T | C | 0.031 | 0.141 | 0.976 | AFR | 0.781 | 0.487 |
| rs11160805 | 14 | 103937732 | C | T | 0.088 | 0.814 | 0.981 | NAM | 0.629 | 0.375 |
| rs7146661 | 14 | 104161600 | G | C | 0.084 | 0.729 | 0.145 | EUR | 0.384 | 0.21 |
| rs4983425 | 14 | 105032574 | G | A | 0.054 | 0.05 | 0.82 | AFR | 0.6 | 0.347 |
| rs8041147 | 15 | 35085650 | T | C | 0.092 | 0.902 | 0.223 | EUR | 0.546 | 0.311 |
| rs2304580 | 15 | 38816959 | T | C | 0.136 | 0.842 | 0.927 | NAM | 0.555 | 0.315 |
| rs8030587 | 15 | 40769098 | A | G | 0.015 | 0.197 | 0.966 | AFR | 0.713 | 0.443 |
| rs2415047 | 15 | 67675432 | A | C | 0.351 | 0.896 | 0.131 | EUR | 0.418 | 0.235 |
| rs11074130 | 15 | 91384746 | G | T | 0.321 | 0.922 | 0.233 | EUR | 0.431 | 0.24 |

| | | | | | | | | | | |
|------------|----|----------|---|---|-------|-------|-------|-----|-------|-------|
| rs12929500 | 16 | 10600333 | A | C | 0.134 | 0.848 | 0.177 | EUR | 0.478 | 0.264 |
| rs9923547 | 16 | 12685472 | A | C | 0.011 | 0.258 | 0.942 | AFR | 0.612 | 0.374 |
| rs10871351 | 16 | 77080407 | G | A | 0.019 | 0.23 | 0.937 | AFR | 0.628 | 0.38 |
| rs1452501 | 16 | 79180763 | C | T | 0.214 | 0.942 | 0.98 | NAM | 0.572 | 0.336 |
| rs2967340 | 16 | 80815052 | A | G | 0.225 | 0.848 | 0.092 | EUR | 0.465 | 0.259 |
| rs4791868 | 17 | 9638969 | G | C | 0.141 | 0.937 | 0.126 | EUR | 0.648 | 0.376 |
| rs2197159 | 17 | 44832634 | T | C | 0.027 | 0.699 | 0.828 | NAM | 0.56 | 0.333 |
| rs1426741 | 17 | 51138511 | G | T | 0.317 | 0.867 | 0.121 | EUR | 0.406 | 0.225 |
| rs1197062 | 17 | 55995900 | C | A | 0.008 | 0.055 | 0.873 | AFR | 0.706 | 0.428 |
| rs4789193 | 17 | 70916391 | A | T | 0.065 | 0.191 | 0.951 | AFR | 0.67 | 0.4 |
| rs507163 | 18 | 32161626 | T | C | 0.118 | 0.751 | 0.155 | EUR | 0.381 | 0.206 |
| rs1893441 | 18 | 45612749 | A | G | 0.08 | 0.805 | 0.966 | NAM | 0.627 | 0.372 |
| rs11667393 | 19 | 54353839 | A | G | 0.069 | 0.738 | 0.199 | EUR | 0.36 | 0.198 |
| rs6112672 | 20 | 1994772 | G | T | 0.057 | 0.837 | 0.209 | EUR | 0.481 | 0.272 |
| rs2889678 | 20 | 30653654 | T | C | 0.031 | 0.703 | 0.058 | EUR | 0.462 | 0.266 |
| rs221308 | 20 | 34709812 | A | G | 0.05 | 0.804 | 0.879 | NAM | 0.631 | 0.369 |
| rs6101991 | 20 | 38515722 | G | A | 0.038 | 0.104 | 0.853 | AFR | 0.608 | 0.352 |
| rs1877751 | 20 | 57401301 | A | G | 0.034 | 0.669 | 0.869 | NAM | 0.544 | 0.323 |
| rs2242865 | 21 | 15948902 | G | T | 0.011 | 0.156 | 0.932 | AFR | 0.695 | 0.422 |
| rs2835367 | 21 | 36805244 | T | C | 0.256 | 0.899 | 0.175 | EUR | 0.471 | 0.262 |
| rs2837352 | 21 | 40285648 | C | T | 0.053 | 0.879 | 0.927 | NAM | 0.721 | 0.429 |
| rs5754506 | 22 | 32013735 | C | T | 0.008 | 0.135 | 0.858 | AFR | 0.599 | 0.356 |
| rs132663 | 22 | 34892970 | A | | 0.027 | 0.684 | 0.893 | NAM | 0.581 | 0.351 |

Anexo 2. Alelos HLA en la población de estudio

| Alelos HLA | Cohorte General (n=511) AF(%) | Norte (n=137) AF(%) | Centro-Sur (n=368) AF(%) | Valor p | Valor q | EUR (>50%) (n=110) AF(%) | AMI (>50%) (n=300) AF(%) | Valor p | Valor q |
|----------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------|---------|---------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| A*01:01 | 0.042 (8.4) | 0.055 (10.9) | 0.038 (7.6) | 0.281 | 0.603 | 0.060 (11.8) | 0.032 (6.3) | 0.094 | 0.225 |
| A*02:01 | 0.214 (42.7) | 0.215 (43.1) | 0.212 (42.1) | 0.298 | 0.633 | 0.183 (36.4) | 0.235 (46.7) | 0.072 | 0.225 |
| A*02:05 | 0.012 (2.3) | 0.007 (1.5) | 0.014 (2.7) | 0.527 | 0.707 | 0.009 (1.8) | 0.012 (2.3) | 1.000 | 0.856 |
| A*02:06 | 0.085 (16.8) | 0.066 (13.1) | 0.092 (18.2) | 0.228 | 0.603 | 0.050 (10.0) | 0.096 (19.0) | 0.035 | 0.190 |
| A*03:01 | 0.054 (10.8) | 0.084 (16.8) | 0.044 (8.7) | 0.015 | 0.325 | 0.078 (15.5) | 0.042 (8.3) | 0.043 | 0.190 |
| A*11:01 | 0.027 (5.3) | 0.029 (5.8) | 0.026 (5.2) | 0.824 | 0.800 | 0.041 (8.2) | 0.027 (5.3) | 0.350 | 0.563 |
| A*23:01 | 0.021 (4.1) | 0.026 (5.1) | 0.019 (3.8) | 0.616 | 0.747 | 0.028 (5.5) | 0.017 (3.3) | 0.387 | 0.563 |
| A*24:02 | 0.145 (29.0) | 0.120 (24.1) | 0.156 (31.0) | 0.152 | 0.547 | 0.110 (21.8) | 0.159 (31.7) | 0.065 | 0.208 |
| A*26:01 | 0.028 (5.5) | 0.018 (3.6) | 0.029 (5.7) | 0.497 | 0.707 | 0.037 (7.3) | 0.025 (5.0) | 0.467 | 0.618 |
| A*29:02 | 0.020 (3.9) | 0.047 (9.5) | 0.010 (1.9) | 0.0003 | 0.325 | 0.037 (7.3) | 0.017 (3.3) | 0.102 | 0.237 |

| | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------|------------------------|------------------------|--------------|--------------|
| A*30:01 | 0.019 (3.7) | 0.018 (3.6) | 0.018 (3.5) | 1.000 | 0.898 | 0.018 (3.6) | 0.018 (3.7) | 1.000 | 0.856 |
| A*30:02 | 0.021 (4.1) | 0.022 (4.4) | 0.021 (4.1) | 0.808 | 0.795 | 0.028 (5.5) | 0.020 (4.0) | 0.587 | 0.697 |
| A*31:01 | 0.064 (12.7) | 0.066 (13.1) | 0.064 (12.8) | 0.882 | 0.807 | 0.064 (12.7) | 0.059 (11.7) | 0.735 | 0.732 |
| A*32:01 | 0.021 (4.1) | 0.026 (5.1) | 0.019 (3.8) | 0.616 | 0.747 | 0.028 (5.5) | 0.018 (3.7) | 0.411 | 0.563 |
| A*33:01 | 0.020 (3.9) | 0.022 (4.4) | 0.019 (3.8) | 0.799 | 0.795 | 0.041 (8.2) | 0.015 (3.0) | 0.031 | 0.190 |
| A*68:01 | 0.072 (14.3) | 0.069 (13.9) | 0.004 (14.4) | 1.000 | 0.898 | 0.046 (9.1) | 0.082 (16.3) | 0.080 | 0.225 |
| A*68:02 | 0.019 (3.7) | 0.018 (3.6) | 0.019 (3.8) | 1.000 | 0.898 | 0.018 (3.6) | 0.022 (4.3) | 1.000 | 0.856 |
| A*68:03 | 0.045 (9.0) | 0.026 (5.1) | 0.053 (10.6) | 0.058 | 0.330 | 0.037 (7.3) | 0.047 (9.3) | 0.694 | 0.711 |
| A*68:05 | 0.012 (2.3) | 0 (0.0) | 0.015 (3.0) | 0.041 | 0.330 | 0.005 (0.9) | 0.015 (3.0) | 0.300 | 0.515 |
| B*07:02 | 0.040 (7.8) | 0.044 (8.8) | 0.036 (7.1) | 0.570 | 0.747 | 0.028 (5.5) | 0.039 (7.7) | 0.520 | 0.630 |
| B*08:01 | 0.024 (4.7) | 0.040 (8.0) | 0.018 (3.5) | 0.056 | 0.330 | 0.032 (6.4) | 0.023 (4.7) | 0.459 | 0.563 |
| B*13:02 | 0.011 (2.2) | 0.007 (11.5) | 0.012 (2.4) | 0.735 | 0.785 | 0.009 (1.8) | 0.013 (2.7) | 1.000 | 0.856 |
| B*14:01 | 0.016 (3.1) | 0.015 (2.9) | 0.016 (3.3) | 1.000 | 0.898 | 0.028 (5.5) | 0.015 (3.0) | 0.244 | 0.290 |
| B*14:02 | 0.039 (7.8) | 0.044 (8.8) | 0.038 (7.6) | 0.711 | 0.781 | 0.060 (11.8) | 0.037 (7.3) | 0.164 | 0.290 |
| B*15:01 | 0.034 (6.8) | 0.026 (5.1) | 0.038 (7.6) | 0.431 | 0.656 | 0.014 (2.7) | 0.042 (8.3) | 0.048 | 0.208 |
| B*15:15 | 0.024 (4.7) | 0.015 (2.9) | 0.026 (5.2) | 0.345 | 0.633 | 0.014 (2.7) | 0.042 (6.3) | 0.216 | 0.290 |
| B*18:01 | 0.026 (5.1) | 0.018 (3.6) | 0.029 (5.7) | 0.497 | 0.707 | 0.032 (6.4) | 0.027 (5.3) | 0.637 | 0.704 |
| B*27:05 | 0.022 (4.3) | 0.026 (5.1) | 0.021 (4.1) | 0.627 | 0.747 | 0.041 (8.2) | 0.015 (3.0) | 0.012 | 0.190 |
| B*35:01 | 0.059 (11.7) | 0.055 (10.9) | 0.062 (12.2) | 0.759 | 0.785 | 0.037 (7.3) | 0.062 (12.3) | 0.069 | 0.290 |
| B*35:12 | 0.035 (7.0) | 0.018 (3.6) | 0.042 (8.4) | 0.079 | 0.498 | 0.023 (4.5) | 0.034 (6.7) | 0.494 | 0.630 |
| B*35:17 | 0.027 (5.3) | 0.036 (7.3) | 0.022 (4.3) | 0.181 | 0.570 | 0.014 (2.7) | 0.023 (4.7) | 0.577 | 0.697 |
| B*38:01 | 0.018 (3.5) | 0.022 (4.4) | 0.016 (3.3) | 0.591 | 0.747 | 0.018 (3.6) | 0.020 (4.0) | 1.000 | 0.856 |
| B*39:01 | 0.026 (5.1) | 0.018 (3.6) | 0.029 (5.7) | 0.497 | 0.707 | 0.018 (3.6) | 0.022 (4.3) | 1.000 | 0.856 |
| B*39:02 | 0.022 (4.3) | 0.026 (5.1) | 0.021 (4.1) | 0.627 | 0.747 | 0 (0.0) | 0.022 (4.3) | 0.024 | 0.190 |
| B*39:05 | 0.056 (11.2) | 0.022 (4.4) | 0.064 (12.8) | 0.005 | 0.325 | 0.041 (8.2) | 0.067 (13.3) | 0.173 | 0.290 |
| B*39:06 | 0.035 (7.0) | 0.018 (3.6) | 0.040 (7.9) | 0.111 | 0.498 | 0.018 (3.6) | 0.045 (9.0) | 0.090 | 0.225 |
| B*40:02 | 0.062 (12.3) | 0.051 (10.2) | 0.067 (13.3) | 0.449 | 0.656 | 0.046 (9.1) | 0.074 (14.7) | 0.186 | 0.290 |
| B*40:08 | 0.010 (2.0) | 0.007 (1.5) | 0.011 (2.2) | 1.000 | 0.898 | 0.009 (1.8) | 0.013 (2.7) | 1.000 | 0.856 |
| B*41:01 | 0.013 (2.5) | 0.011 (2.2) | 0.014 (2.7) | 1.000 | 0.898 | 0.014 (2.7) | 0.010 (2.0) | 0.706 | 0.727 |
| B*44:02 | 0.020 (3.9) | 0.033 (6.6) | 0.015 (3.0) | 0.075 | 0.460 | 0.041 (8.2) | 0.010 (2.0) | 0.006 | 0.190 |

| | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
| B*44:03 | 0.036 (7.2) | 0.055 (10.9) | 0.029 (5.7) | 0.051 | 0.330 | 0.064 (12.7) | 0.035 (7.0) | 0.074 | 0.225 |
| B*45:01 | 0.012 (2.3) | 0.018 (3.6) | 0.010 (1.9) | 0.322 | 0.633 | 0.018 (3.6) | 0.007 (1.3) | 0.219 | 0.290 |
| B*48:01 | 0.033 (6.5) | 0.029 (5.8) | 0.034 (6.8) | 0.840 | 0.800 | 0.032 (6.4) | 0.034 (6.7) | 1.000 | 0.856 |
| B*49:01 | 0.015 (2.9) | 0.007 (1.5) | 0.018 (3.5) | 0.375 | 0.639 | 0.028 (5.5) | 0.010 (2.0) | 0.093 | 0.225 |
| B*50:01 | 0.010 (2.0) | 0.007 (1.5) | 0.011 (2.2) | 1.000 | 0.898 | 0.009 (1.8) | 0.008 (1.7) | 1.00 | 0.856 |
| B*51:01 | 0.058 (11.5) | 0.091 (18.2) | 0.047 (9.2) | 0.008 | 0.325 | 0.064 (12.7) | 0.055 (11.0) | 0.604 | 0.697 |
| B*52:01 | 0.029 (5.9) | 0.018 (3.6) | 0.033 (6.5) | 0.284 | 0.603 | 0.014 (2.7) | 0.040 (8.0) | 0.071 | 0.208 |
| B*53:01 | 0.015 (2.9) | 0.011 (2.2) | 0.016 (3.3) | 0.769 | 0.785 | 0.018 (3.6) | 0.015 (3.0) | 0.754 | 0.732 |
| C*01:02 | 0.061 (12.3) | 0.055 (10.9) | 0.064 (12.8) | 0.649 | 0.752 | 0.059 (11.8) | 0.070 (14.0) | 0.627 | 0.697 |
| C*02:02 | 0.028 (5.5) | 0.022 (4.4) | 0.030 (6.0) | 0.662 | 0.752 | 0.059 (11.8) | 0.018 (3.7) | 0.004 | 0.190 |
| C*03:03 | 0.042 (8.6) | 0.033 (6.6) | 0.046 (9.2) | 0.376 | 0.639 | 0.018 (3.6) | 0.050 (10.0) | 0.043 | 0.190 |
| C*03:04 | 0.066 (13.1) | 0.062 (12.4) | 0.068 (13.6) | 0.770 | 0.795 | 0.064 (12.7) | 0.077 (15.3) | 0.636 | 0.697 |
| C*03:05 | 0.017 (3.3) | 0.004 (0.7) | 0.022 (4.3) | 0.051 | 0.330 | 0 (0.0) | 0.023 (4.7) | 0.026 | 0.190 |
| C*03:06 | 0.010 (2.0) | 0.011 (2.2) | 0.010 (1.9) | 0.735 | 0.785 | 0 (0.0) | 0.013 (2.7) | 0.115 | 0.253 |
| C*04:01 | 0.182 (36.2) | 0.197 (39.4) | 0.176 (35.1) | 0.405 | 0.646 | 0.164 (32.7) | 0.173 (34.3) | 0.814 | 0.856 |
| C*05:01 | 0.040 (7.2) | 0.051 (10.2) | 0.031 (6.3) | 0.129 | 0.517 | 0.064 (12.7) | 0.028 (5.7) | 0.021 | 0.190 |
| C*06:02 | 0.037 (7.4) | 0.047 (9.5) | 0.034 (6.8) | 0.343 | 0.633 | 0.045 (9.1) | 0.035 (7.0) | 0.528 | 0.637 |
| C*07:01 | 0.073 (14.7) | 0.073 (14.6) | 0.075 (14.9) | 1.000 | 0.898 | 0.114 (22.7) | 0.059 (11.7) | 0.007 | 0.190 |
| C*07:02 | 0.180 (35.8) | 0.146 (29.2) | 0.186 (37.0) | 0.116 | 0.517 | 0.114 (22.7) | 0.193 (38.3) | 0.003 | 0.190 |
| C*08:01 | 0.043 (8.6) | 0.055 (10.9) | 0.040 (7.9) | 0.289 | 0.603 | 0.027 (5.5) | 0.049 (9.7) | 0.232 | 0.290 |
| C*08:02 | 0.058 (11.5) | 0.062 (12.4) | 0.057 (11.4) | 0.757 | 0.785 | 0.086 (17.3) | 0.055 (11.0) | 0.096 | 0.225 |
| C*12:03 | 0.036 (7.2) | 0.033 (6.6) | 0.038 (7.6) | 0.848 | 0.800 | 0.036 (7.3) | 0.037 (7.3) | 1.000 | 0.856 |
| C*14:02 | 0.011 (2.2) | 0.018 (3.6) | 0.008 (1.6) | 0.179 | 0.559 | 0.009 (1.8) | 0.012 (2.3) | 1.000 | 0.856 |
| C*15:02 | 0.025 (4.9) | 0.029 (5.8) | 0.023 (4.6) | 0.645 | 0.747 | 0.032 (6.4) | 0.017 (3.3) | 0.173 | 0.290 |
| C*16:01 | 0.030 (6.1) | 0.051 (10.2) | 0.023 (4.6) | 0.035 | 0.330 | 0.045 (9.1) | 0.027 (5.3) | 0.174 | 0.290 |
| C*17:01 | 0.018 (3.5) | 0.026 (5.1) | 0.015 (3.0) | 0.282 | 0.603 | 0.023 (4.5) | 0.012 (2.3) | 0.318 | 0.518 |

Se muestran los alelos HLA presentes en más de 10 individuos. La frecuencia alélica (AF) se define como la proporción del alelo sobre el total de alelos observados en el mismo locus. El porcentaje se define como el número de individuos que poseen el alelo dividido por el número total de individuos en el grupo. Las comparaciones significativas ($p < 0.05$, $q < 0.2$) se muestran en negritas.

Killer cell immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen gene profiles in a cohort of HIV-infected Mexican Mestizos

Daniela Garrido-Rodríguez¹ · Santiago Ávila-Ríos¹ · Claudia García-Morales¹ · Humberto Valenzuela-Ponce¹ · Christopher Ormsby¹ · Helena Reyes-Gopar¹ · Juan Carlos Fernandez-Lopez² · Gustavo Reyes-Terán¹

Received: 8 February 2016 / Accepted: 21 May 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) represent the most polymorphic genes responsible for natural killer cell function, while human leukocyte antigen (HLA) class I molecules define and restrict cytotoxic T lymphocyte responses. Specific KIR, HLA, or KIR-HLA combinations have been implicated in the outcome of human immunodeficiency virus (HIV) disease. The remarkable polymorphism of KIR and HLA genes warrants descriptive gene frequency studies in different populations, as well as their impact on HIV disease progression in different immunogenetic contexts. We report KIR and HLA class I gene profiles of 511 unrelated HIV-infected Mexican Mestizo individuals from 18 states for whom genetic ancestry proportions were assessed. KIR and HLA gene profiles were compared between individuals from the north and central-south regions of the country and between individuals with higher European (EUR) or Amerindian (AMI) genetic ancestry component. A total of 65 KIR genotypes were observed, 11 harboring novel KIR gene combinations. A total of 164 HLA alleles were observed: 43 HLA-A, 87 HLA-B, and 34 HLA-C. Differences in the distribution of 12 HLA alleles were observed between individuals with higher AMI or EUR ancestry components ($p < 0.05$, $q < 0.2$). After correcting for genetic

ancestry, only individual HLA alleles were associated with HIV disease progression, including a novel association with A*02:06, an Amerindian HLA allele associated with lower CD4+ T cell counts. No KIR effects were significant. Our results highlight the advantages of considering a detailed genetic stratification within populations when studying genetic profiles that could be implicated in disease-association studies.

Keywords HLA · KIR · Human immunodeficiency virus · Immunogenetics · Mexican Mestizo · Ancestry genetic proportions

Introduction

Killer cells immunoglobulin-like receptors (KIRs) are the most complex, diverse, and rapidly evolving receptors of natural killer (NK) cells. The KIR locus spans a region of approximately 150 kb on chromosome 19q13.4 and is part of the leukocyte receptor complex (LRC) (Suto et al. 1996). KIR proteins contain two or three external immunoglobulin-like domains (2D, 3D) with either long (L) or short (S) cytoplasmic tails generally corresponding to their function as inhibitory or activating KIR genes, respectively (Campbell and Purdy 2011; Long et al. 2013; Moretta et al. 2000; Uhrberg et al. 1997; Vales-Gomez et al. 1998).

KIRs have been implicated in the outcome of several infectious diseases including human immunodeficiency virus (HIV). It has been previously reported that the combination of KIR3DL1 with its ligand human leukocyte antigen (HLA)-Bw4 with an isoleucine at position 80 (HLA-Bw4^{80Ile}) is associated with delayed progression to AIDS, and with lower plasma viral load (pVL) setpoint in early HIV infection (Flores-Villanueva et al. 2001; Gaudieri et al., 2005b; Jiang

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00251-016-0920-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gustavo Reyes-Terán
gustavo.reyesteran@gmail.com

¹ National Institute of Respiratory Diseases, Centre for Research in Infectious Diseases, Calzada de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

² National Institute of Genomic Medicine, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610 Mexico City, Mexico

et al. 2013; Martin et al. 2002). In agreement to this, the combined genotype of KIR3DL1 and HLA-Bw4 has been reported to be associated with higher CD4+ T cell counts in a Mexican Mestizo HIV-infected cohort (Hernandez-Ramirez et al. 2015b). Nevertheless, several associations of KIR genes, HLA molecules, or the presence of KIR-HLA interactions with HIV disease outcome have not been consistent among populations/cohorts (Alter et al. 2007; Barbour et al. 2007; Boulet et al. 2008; Cohen et al. 1999; Christiansen et al., 2002; Gaudieri et al. 2005a; Jennes et al. 2006, 2011; Long et al. 2008; Martin et al. 2002; Martin et al. 2007; O'Connor et al. 2007). Whether these differences are related to the well-known polymorphism and differential worldwide distribution of HLA alleles (Goulder and Watkins 2008; Williams et al. 2001) and KIR genes (Gonzalez-Galarza et al. 2011; Hollenbach et al. 2010; Hollenbach et al. 2012) is incompletely described.

Mexican Mestizos are an admixed population characterized by the combination of mainly European and Amerindian genes (Pereyra et al. 2010; Ruiz-Linares et al. 2014). Studies on KIR gene frequency in Mexican populations have been previously published; however, they have been centered on specific regions of the country and lack genetic background characterizations of the study cohorts (Alvarado-Hernandez et al. 2011; Contreras et al. 2007; Gutierrez-Rodriguez et al. 2006).

Given the important role of KIR, HLA, and KIR-HLA interactions for HIV disease outcome, and given the genetic richness of Mestizo populations, describing KIR and HLA gene diversity and profiles in Mexico looking for possible relevant associations with HIV disease outcome is relevant. Furthermore, admixed populations provide an opportunity to study the effect of genetic stratification in gene frequency distributions within a single population. To this end, we characterized KIR gene, genotype, and haplotype diversity, as well as HLA class I allelic and serologic motif frequency distributions in a large cohort of unrelated HIV-infected Mexican Mestizo individuals attending health centers in 18 Mexican states for whom ancestry genotyping was performed. Our results provide a detailed characterization of KIR and HLA gene diversity with high national representativity. We also highlight the importance of including genetic ancestry stratification within an admixed population when studying genetic associations with disease outcome.

Materials and methods

Subjects

Peripheral blood samples were obtained from 511 HIV subtype B-infected, antiretroviral treatment (ART)-naïve

individuals with CD4+ T cell counts ≥ 350 cells/ml. Individuals were enrolled at different health centers in Jalisco, Michoacan, Baja California, Sonora, Sinaloa, and Nuevo Leon from the north region of the country and Mexico City, Hidalgo, Puebla, State of Mexico, Veracruz, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Quintana Roo, and Yucatan from the Center-South region of the country (Fig. 1). All blood samples were shipped to and processed at the Centre for Research in Infectious Diseases (CIENI) of the INER in Mexico City.

DNA extraction, human leukocyte antigen, and killer immunoglobulin-like receptor typing

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque; Pharmacia, Uppsala, SE) and cryopreserved in 90 % fetal calf serum (FCS; Canadian Life Technologies, Burlington, ON, CA) supplemented with 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Genomic DNA was extracted from six million PBMCs using the QIAamp DNA blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA), following manufacturer's instructions.

The presence and absence of 16 distinct KIR genes was determined at low resolution from genomic DNA by sequence-specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR) (KIR Genotyping SSP Kit, Invitrogen, Brown Deer, WI) following manufacturer's instructions.

Class I HLA-A, HLA-B, and HLA-C genes were typed at four-digit resolution from genomic DNA by sequence-based typing, using commercial kits (SeCore Locus A, B and C; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) following manufacturer's instructions, using a 3730xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

HIV plasma viral load setpoint and CD4+ T cell count determination

HIV plasma viral load (pVL) was determined by automated real-time PCR using the m2000 system (Abbott, Abbott Park, IL). HIV pVL setpoints were calculated for each participating individual. For this, a moving average approach was applied for all pVL measurements prior to the initiation of ART available for each participating individual with an average follow-up time of 18 months (range 12–36 months).

CD4+ T cell counts were determined by flow cytometry using the Trucount Kit in FACSCanto II instruments (BD Biosciences, San Jose, CA).

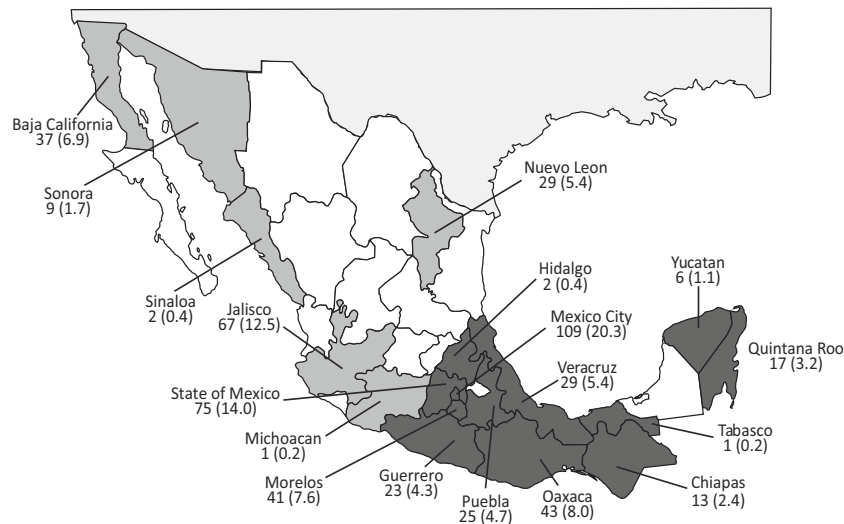


Fig. 1 Geographical distribution of HIV-infected Mexican Mestizo individuals included in the study. The map shows data from 511 HIV-infected individuals enrolled. States in light gray represent individuals from the north region of the country; states in dark gray represent

individuals from the central-south region of the country. The number of individuals and their corresponding proportion in the study cohort [n (%)] is shown for each state. Data was not available for six individuals

KIR genotype and haplotype designation

The presence or absence of KIR genes was determined using the worksheet provided by the manufacturer. The percentage of individuals carrying each KIR gene was determined by direct counting. Failed reactions due to lack of control band or no amplification at all were repeated. Haplotypes were inferred for each sample based on gene content as follows. Genotypes including KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DP1, KIR3DP1, KIR2DL4, KIR3DL1, and KIR2DS4 genes were considered to be homozygous for the A haplotype and assigned the KIR genotype AA designation. Individuals lacking any of the four A haplotype-associated genes (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, and KIR2DS4) were regarded as B haplotypes and assigned the KIR genotype Bx designation. No difference was made between AB and BB haplotypes. The four framework KIR genes (KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DP1, and KIR2DL4) were present in all genotypes. Frequencies of AA and Bx haplotypes were calculated by direct counting considering the presence or absence of A and B haplotype-associated KIR genes as described above.

Bx genotypes were further classified based on the presence or absence of centromeric and telomeric gene clusters. The centromeric gene cluster (C4) includes KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS3, and KIR2DL5 genes. The telomeric gene cluster (T4) includes KIR3DS1, KIR2DL5, KIR2DS1, and KIR2DS5 genes (Du et al. 2008). On the basis of the presence or absence of C4 and T4 clusters, four subsets were defined: C4Tx (presence of C4 and absence of T4), CxT4

(absence of C4 and presence of T4), C4T4 (presence of both C4 and T4), and CxTx (absence of both C4 and T4).

HLA allele and serologic motif designation

Allele assignments were made using the uTYPE v6.0 software (Thermo Fisher Scientific). Ambiguities were resolved by frequency using the HLA Completion tool, available online (Listgarten et al. 2008). HLA groups were defined according to the residues observed at positions 77–80. Bw4 was defined by the presence of threonine or isoleucine at position 80 and Bw6 by the presence of asparagine at the same position. HLA-C1 was defined by the presence of serine at position 77 and asparagine at position 80, while HLA-C2 was defined by the presence of asparagine at position 77 and lysine at position 80.

Ancestry genotyping

Genomic DNA was extracted as mentioned above. Individuals were genotyped to determine ancestral components with a subset of 128 ancestry informative markers (AIM), selected from a panel previously reported as informative in Latin American populations (Martin et al. 2010) (Table S1), using the OpenArray technology in a QuantStudio 12K flex System (Thermo Fisher Scientific). Briefly, genomic DNA samples were normalized at 50 ng/ μ l and 2.5 μ l of DNA were mixed with 2.5 μ l of TaqMan OpenArray Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific) on 384-well plates. Mixes were loaded onto genotyping OpenArray plates preloaded with the genotyping primers and probes, using AccuFill System (Thermo Fisher Scientific). Amplification was carried out

following the manufacturer's protocol. Results were analyzed using the TaqMan Genotyper v1.2 software. Quality control tests were performed on the data, using Plink software (Purcell et al. 2007). Individuals were excluded from the analysis if they had greater than 10 % missing alleles.

Analysis of ancestral components

Two different methods were applied to define genetic ancestry proportions in the Mexican HIV study cohort. First, principal component analysis (PCA) was applied using the three main ancestral populations relevant for Mexican Mestizos: European, African, and Amerindian. Genotype data for African and European populations was downloaded from HapMap Phase II + III (Frazer et al. 2007; Tiemessen et al. 2011), including Yoruba in Ibadan, Nigeria (YRI), from now on referred to as AFR and Northern European (CEU) from now on referred to as EUR. Genotype data for the Amerindian (from now on referred to as AMI) group (Zapoteco from Oaxaca State) was obtained from the Mexican Genome Diversity Project (MGDP) (Moreno-Estrada et al. 2014; Pereyra et al. 2010). In order to measure genetic distances between individuals in the HIV cohort and the ancestral populations, we performed a pairwise F_{ST} statistical analysis. Both F_{ST} and PCA were calculated with EIGENSOFT (Patterson et al. 2006). Second, to assess genetic ancestry and to explain the three major substructures in the HIV Mexican cohort, we calculated mean ancestral proportions with STRUCTURE software (Falush et al. 2003; Falush et al. 2007; Hubisz et al. 2009; Pritchard et al. 2000), using the Admixture model and setting $K = 3$ (number of ancestral populations), including the 128 AIMs selected as described above (Table S1), and the HapMap and Amerindian group data.

Statistical analysis

HLA and KIR gene frequency comparisons

Historically, Mexican Mestizo individuals with higher content of European genes are frequently located in the north region of the country, while individuals with higher content of Amerindian genes are principally located in the South region (Barquera et al. 2008; Pereyra et al. 2010). Considering this, we looked for possible differences in KIR and HLA gene frequency distributions between individuals from the north and central-south regions (Fig. 1), and between individuals with higher (>50 %) European (EUR) or Amerindian (AMI) genetic ancestry proportions. Differences between the north and central-south regions or between individuals with higher AMI and EUR genetic ancestry proportions were estimated by two-tailed Fisher's exact test, and false discovery rate for

multiple comparisons was estimated with Storey q -values (Storey 2002) with the q -value Bioconductor package of R. The threshold for significance was set at $p < 0.05$ and $q < 0.2$. All frequency comparisons were performed using the software Stata/SE version 12 (StataCorp, College Station, TX).

Assessment of the presence of underlying population structure

The patients in our cohort were enrolled at HIV clinics in different states collaborating with the CIENI, INER, using convenience sampling. Hence, we had no a priori means to guarantee that there was no genetic bias in our sample. We applied Multiple Correspondence Analysis (MCA) on all the independent genetic variables (SNPs, HLA alleles, and KIR alleles) to determine if there was some underlying population structure in the data. Analyses were performed with R.

Variable reduction strategy

Due to the large number of independent genetic variables to be analyzed, and given that many of those variables would be correlated with each other, we implemented a variable reduction strategy based on a method described by (Karim et al. 2013). Briefly, we employed PCA to reduce the dimensionality of our HLA and KIR gene variables and used the eigenvectors from the first five dimensions to locate the subject that had the highest score in each of them. Next, we performed a k-means algorithm of the variables using the previous values as starting points for the clusters. We resampled with replacement (bootstrapping) 1000 times and recorded how the variables clustered each time. The variables that shared a cluster in at least 70 % of replicates were collapsed in a composite variable. The threshold was decided based on the results of applying our strategy to random databases.

Multivariate data analysis

For the multivariate data analysis, we used as dependent clinical variables CD4+ T cell count (cells/ml), HIV pVL (log₁₀ RNA copies/ml), and a Z-score, which was created as a proxy variable for HIV disease progression for each individual, defined as

$$Z\text{-score} = \frac{[(CD4 - \text{mean}CD4) / \text{sd}CD4] - [(VL - \text{mean}VL) / \text{sd}VL]}{2}$$

Higher Z-score values were associated with individuals presenting higher CD4+ T cell counts and lower pVL, whereas low Z-score values represented the opposite. The independent genetic variables (including composite variables) were ancestry (obtained from the 128 genotyped SNPs), region of origin (north, central-south), HLA alleles, HLA serological motifs (Bw4, Bw6, C1, C2), KIR genes (excluding framework

genes), and KIR haplotype (AA, Bx). We also included combinations of KIR and HLA genes. All possible combinations between KIR2D and HLA-C and KIR3D and HLA-B were studied, thus considering all previously described KIR-HLA pairs with known interaction and possible new KIR-HLA pairs that could interact, but for which no associations have been previously described (Lanier 1998). The following analyses were performed only on variables with at least 12 individuals in each 0 and 1 category (all variables were dichotomic); this requirement allowed us to detect effects with confidence and it was determined through power calculation considering the sample size.

First, we conducted univariate analyses on each of the genetic variables for every clinical variable. Then, we carried out multivariate logistic regressions for every independent genetic variable with sex and age as confounding variables, and in each individual regression, we used as covariates all of the other genetic variables that resulted significant ($p < 0.05$) in the univariate analysis for the dependent clinical variable examined. All analyses were performed with R.

Results

Study cohort

A total of 511 unrelated HIV subtype B-infected, antiretroviral treatment (ART)-naïve individuals at early chronic phase of HIV infection were recruited, with a median CD4+ T cell count of 551 cells/ μ l (interquartile range (IQR) 441–

686 cells/ μ l) and a median pVL setpoint of 4.4 log RNA copies/ml (IQR 3.8–4.8 log RNA copies/ml) (Table 1). Individuals enrolled in this study came from HIV clinics in 18 Mexican states from the north and central-south region (Fig. 1) that all together contribute with nearly 80 % of the total number of HIV infections reported in the country (CENSIDA 2012). Most participants (73 %) came from the states of the central-south region while 27 % came from the north region (Fig. 1). The male-to-female ratio was 3 to 1, as expected according to previous national reports (UNAIDS 2012; WHO 2011).

Genetic ancestry of 80 % (410/511) individuals was successfully performed using a previously described panel of 128 ancestry informative markers to discriminate between three ancestral populations: Amerindian (AMI), African (AFR), and European (EUR) (Table S1) (Martin et al. 2010). Principal component analysis (PCA) revealed that the AFR component was the most distinct from HIV-infected Mexican individuals and that all Mexican HIV-infected individuals were more closely related to the EUR and the AMI reference populations, as expected (Fig. 2). To confirm the ancestral genetic characteristics of the Mexican cohort, we performed an F_{ST} analysis to measure genetic distances between our study cohort and the ancestral reference populations (Table S2). HIV-infected individuals showed the lowest F_{ST} values in relation to the AMI reference population (2.08) followed by the EUR reference population (2.72). The highest values were observed between reference population: AFR vs. AMI (7.32), followed by EUR vs. AMI (6.43) (Table S2). F_{ST} values were

Table 1 Clinical and demographic data characteristic of our study cohort

| | All | North ^a | Central-south ^a | EUR 50 % ^d | AMI 50 % ^d |
|--|---------------|--------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Demographic data | | | | | |
| Individuals enrolled | 511 | 137 (27.1) | 368 (72.9) | 110 (26.8) | 300 (73.2) |
| Female [n (%)] ^b | 102 (20.0) | 31 (22.8) | 68 (18.5) | 20 (18.3) | 61 (20.3) |
| p value | | 0.312 | | 0.779 | |
| Age [years; median (IQR)] ^c | 28 (23–36) | 33 (26–38) | 27 (23–34) | 32 (26–39) | 27 (22–34) |
| p value | | <0.0001 | | <0.0001 | |
| Clinical data | | | | | |
| pVL setpoint [log RNA copies/ μ l; median (IQR)] | 4.4 (3.8–4.8) | 4.3 (3.8–4.6) | 4.4 (3.8–4.8) | 4.4 (3.8–4.8) | 4.4 (3.8–4.8) |
| p value | | 0.108 | | 0.799 | |
| CD4+ T cell count [cells/ml; median (IQR)] | 551 (441–686) | 550 (449–677) | 553 (439–697) | 598 (460–740) | 534 (435–651) |
| p value | | 0.783 | | 0.0260 | |

Differences between groups were estimated using Fisher's Exact test, Mann-Whitney, or Linear Regression according to type of variable. Statistical significance was considered if $p < 0.05$

^a Geographical data for six individuals are missing

^b Data for 1 individual is missing

^c Data for 16 individuals are missing

^d The total number of individuals with genetic ancestry proportion determination was 410

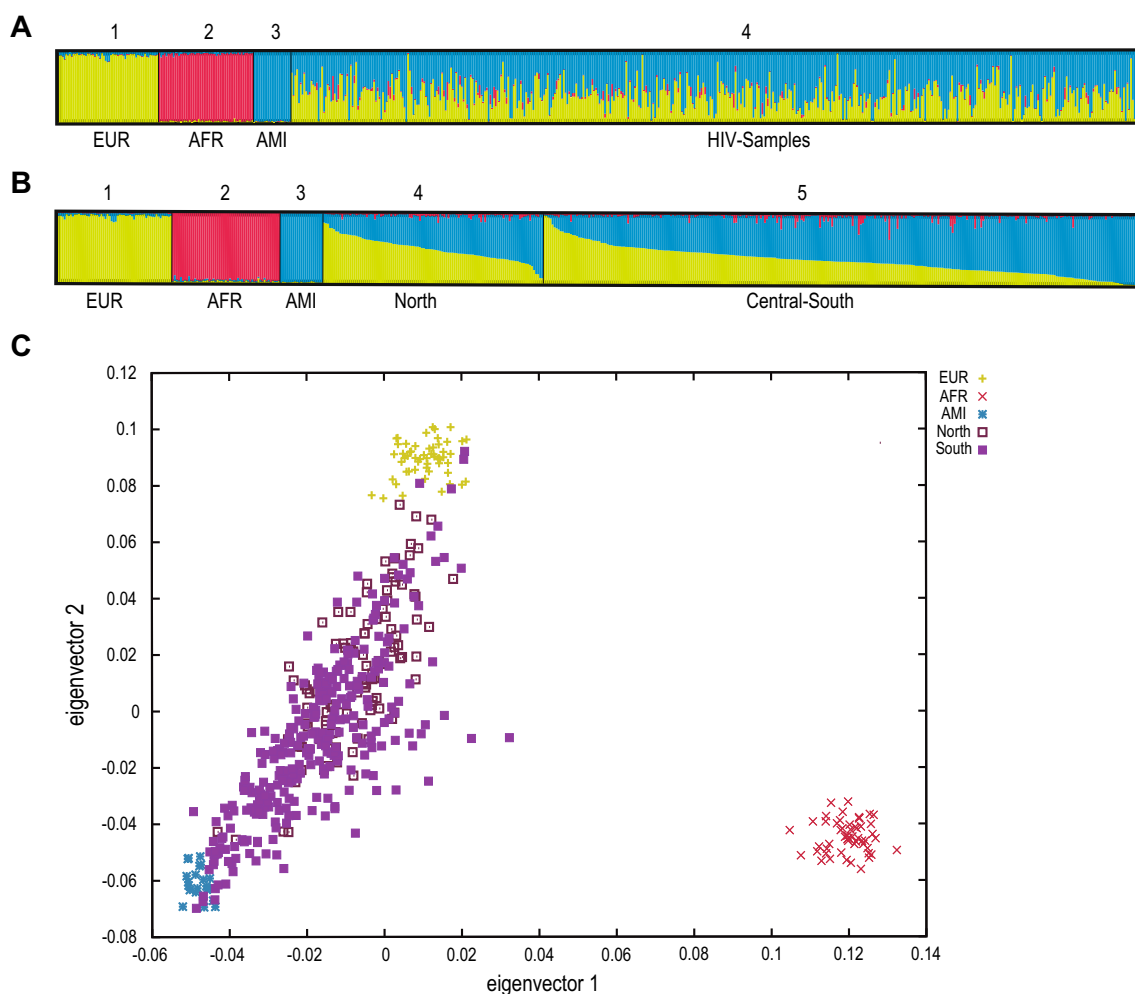


Fig. 2 Principal component analysis for genetic ancestry assessment of 476 HIV-infected Mexican individuals. Individuals were genotyped using a panel of 128 ancestry informative markers (AIM), previously reported as informative in Latin American populations (Pereyra et al. 2010), in order to determine ancestral backgrounds. Genotype data for ancestral African (AFR) and European (EUR) populations was downloaded from HapMap Phase II + III (Frazer et al. 2007; Tiemessen et al. 2011), and genotype data for the ancestral Amerindian (AMI) population was obtained from the Mexican Genome Diversity Project (MGDP) (Moreno-Estrada et al. 2014; Pereyra et al. 2010). **a** Admixture was

estimated using the method by Pritchard et al., implemented in the software Structure (Pritchard et al. 2000); each *vertical bar* represents an individual and his/her admixture proportions based on the parental populations shown on the *left end*. **b** Admixture proportions of the HIV cohort are shown, ordered by geographical region; each *vertical bar* represents an individual and his/her admixture proportions based on the parental populations shown on the *left end*. **c** Analysis of the first two principal components including the three ancestral populations and all HIV-infected Mexican individuals. Populations are identified by colors and shapes according to the legend

consistent with PCA results. Additionally, mean ancestries were 0.416 EUR, 0.026 AFR, and 0.557 AMI for the HIV-infected Mexican cohort overall. Thus, the higher AMI contribution to the ancestry of the study population observed with this model was consistent with the PCA (Fig. 2) and F_{ST} analyses (Table S3).

In order to determine whether the north and central-south regions were characterized by different genetic backgrounds, we compared the proportion of individuals with higher AMI or EUR ancestry proportions in each geographic region. We observed a larger proportion of individuals with higher AMI ancestral component proportion compared to individuals with higher EUR ancestral component in the central-south region

($p < 0.0001$), as expected. No difference was observed in the north region. PCA and F_{ST} analysis confirmed these results, with a higher mean genetic distance observed between individuals from the central-south region and the EUR reference ancestral population (3.03) compared to individuals from the north region (1.96, $p < 0.00001$) (Fig. 2) (Table S2).

KIR gene frequencies

KIR gene typing was obtained for the 511 individuals enrolled in the study. The four framework genes (KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DP1, and KIR2DL4) were present in 100 % of the participants. KIR2DL1 and KIR3DL1 were the

most frequent genes observed in the study cohort (98 and 96 %, respectively) while KIR2DS3 was the least frequent (16 %, Table 2).

Most KIR gene frequencies were similar between the north and central-south regions and between individuals with higher EUR and AMI genetic ancestry components (Table 2). Nevertheless, significant differences were observed between the north and central-south region on B haplotype-associated KIR genes: KIR3DS1 ($p = 0.005$, $q = 0.11$), KIR2DS1 ($p = 0.011$, $q = 0.11$), KIR2DS5 ($p = 0.014$, $q = 0.11$), and KIR2DL5 ($p = 0.025$, $q = 0.12$) were in higher frequencies in individuals from the north (Table 2). Considering genetic ancestry components, KIR2DL3 was more frequent in individuals with higher AMI ancestry proportion ($p = 0.015$, $q = 0.12$) (Table 2).

KIR genotype and haplotype profiles

A total of 65 KIR genotypes carrying different numbers and combinations of 16 KIR genes were observed in the study cohort. From these, 54 corresponded to previously reported genotypes while 11 represented novel genotypes (Fig. 3). Considering the total number of KIR genotypes observed, 62 (95 %) were predicted to be Bx and 3 (5 %) were AA (Fig. 3).

The most frequent genotype observed in the study cohort was genotype 1 (AA), followed by genotype 2 (Bx) and genotype 4 (Bx) (33, 12, and 11 %, respectively). Thirty-five genotypes were observed in more than one instance, encompassing 95 % of the study population. However, 30 genotypes were represented by a single observation, all together encompassing 5 % of the study population. From the 11 novel KIR genotypes found in the present study (CIENI01-CIENI11), 8 were observed in a single individual (CIENI05-CIENI11), while CIENI01 and CIENI02 were observed in three individuals each, and CIENI03 in two individuals. All the novel genotypes were predicted to be Bx genotypes (Fig. 3).

We further classified Bx haplotypes in four different subsets according to the presence or absence of telomeric (T4) and centromeric (C4) gene clusters, as described in “Materials and methods” (Du et al. 2008). The four subsets of Bx genotypes (CxT4, C4Tx, C4T4, and CxTx) were present in the study cohort. Individuals displaying CxT4 genotype carried three to six activating KIR genes (27 % carried four activating KIRs), while individuals displaying C4Tx carried three to five activating KIR genes (6 % carried three activating KIRs), individuals displaying C4T4 genotype carried five to six activating KIR genes (4 % carried five activating KIRs), and individual displaying CxTx genotype carried one to five activating KIR genes (21 % carried two activating KIRs). From the novel haplotypes observed in the study cohort,

Table 2 Observed KIR gene frequencies in Mexican Mestizos from the north and central-south region and with higher European or Amerindian ancestry proportions

| | A. haplotype-associated KIR genes | | | | B. haplotype-associated KIR genes | | | | Framework and pseudogenes | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 2DL1 %F (N) | 2DL3 %F (N) | 3DL1 %F (N) | 2DS4 %F (N) | 2DL2 %F (N) | 2DL5 %F (N) | 3DS1 %F (N) | 2DS1 %F (N) | 2DS2 %F (N) | 2DS3 %F (N) | 2DS5 %F (N) | 2DL4 %F (N) | 3DL2 %F (N) | 3DL3 %F (N) | 2DP1 %F (N) | 3DP1 %F (N) |
| All ($n = 511$) | 98.0 (501) | 93.9 (408) | 96.1 (491) | 91.6 (468) | 45.4 (232) | 50.9 (260) | 43.1 (220) | 42.7 (218) | 44.6 (228) | 16.6 (85) | 40.7 (208) | 100.0 (511) | 100.0 (511) | 100.0 (511) | 96.1 (491) | 100.0 (511) |
| North ($n = 137$) | 98.5 (135) | 91.0 (124) | 96.4 (132) | 91.2 (125) | 45.3 (62) | 60.6 (83) | 53.3 (73) | 51.8 (71) | 45.3 (62) | 16.1 (22) | 49.6 (68) | 100.0 (137) | 100.0 (137) | 100.0 (137) | 94.9 (130) | 100.0 (137) |
| Central-south ($n = 368$) | 97.8 (360) | 95.3 (350) | 95.9 (353) | 91.6 (337) | 45.9 (169) | 47.3 (174) | 39.1 (144) | 39.1 (144) | 44.8 (165) | 17.1 (63) | 37.2 (137) | 100.0 (368) | 100.0 (368) | 100.0 (368) | 96.7 (356) | 100.0 (368) |
| <i>p</i> value | | | | | 0.025 | 0.005 | 0.011 | 0.011 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | | | | | |
| <i>q</i> -value | | | | | 0.12 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 | | | | | |
| EUR >50 % ($n = 110$) | 98.1 (108) | 89.1 (98) | 95.5 (105) | 90.0 (99) | 41.8 (46) | 52.7 (58) | 46.4 (51) | 45.5 (50) | 43.6 (48) | 13.6 (15) | 42.7 (47) | 100.0 (110) | 100.0 (110) | 100.0 (110) | 95.5 (105) | 100.0 (110) |
| AMI >50 % ($n = 300$) | 98.0 (294) | 96.0 (288) | 96.0 (288) | 94.7 (284) | 43.3 (130) | 48.7 (146) | 41.3 (124) | 41.0 (123) | 42.0 (126) | 14.0 (42) | 39.3 (118) | 100.0 (300) | 100.0 (300) | 100.0 (300) | 96.3 (289) | 100.0 (300) |
| <i>p</i> value | | | | | 0.015 | | | | | | | | | | | |
| <i>q</i> -value | | | | | 0.12 | | | | | | | | | | | |

Frequency (%F) of each gene is expressed as percentage and defined as the number of individuals carrying the gene (N) divided by the number of individuals in the corresponding population sub-group (n). *p* and *q*-values are shown only for significant comparisons ($p < 0.05$, $q < 0.2$)

| Genotype | | Group A haplotype associated genes | | | | Group B haplotype associated genes | | | | | | Framework/Pseudogenes | | | | | Gp Frequency | | | | | |
|----------|-----------|------------------------------------|------|------|------|------------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------------|------|------|------|------|--------------|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Number | Haplotype | Bx subset | | | | | | | | | | | | | | | | All (n=511) % (N) | North (n=137) % (N) | South (n=368) % (N) | EUR 50% (n=110) % (N) | AMI 50% (n=300) % (N) |
| | | | 2DL1 | 2DL3 | 3DL1 | 2DS4 | 2DS2 | 2DL2 | 2DS3 | 2DL5 | 3DS1 | 2DS5 | 2DS1 | 2DP1 | 3DP1 | 2DL4 | 3DL2 | | | | | |
| 1 | AA | - | | | | | | | | | | | | | | | | 32.9 (168) | 26.3 (36) | 35.1 (129) | 27.3 (30) | 36 (108) |
| 4 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 12.1 (62) | 8.8 (12) | 13.6 (50) | 14.5 (16) | 11.6 (35) |
| 2 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 11.9 (61) | 13.9 (19) | 10.9 (40) | 14.5 (16) | 13.3 (40) |
| 3 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 8.0 (41) | 10.9 (15) | 7.1 (26) | 5.5 (6) | 9.3 (28) |
| 5 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 3.9 (20) | 3.6 (5) | 4.1 (15) | 5.5 (6) | 3.0 (9) |
| 7 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 2.0 (10) | 1.5 (2) | 2.2 (8) | 2.7 (3) | 1.3 (4) |
| 93 | Bx | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | 2.0 (10) | 1.5 (2) | 2.2 (8) | 1.8 (2) | 0.3 (1) |
| 80 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 1.6 (8) | 1.5 (2) | 1.6 (6) | 0.9 (1) | 1.6 (5) |
| 154 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 1.6 (8) | 0.7 (1) | 1.9 (7) | 2.7 (3) | 1.3 (4) |
| 180 | AA | - | | | | | | | | | | | | | | | | 1.6 (8) | 2.9 (4) | 1.1 (4) | 2.7 (3) | 0.6 (2) |
| 6 | Bx | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | 1.4 (7) | 0.7 (1) | 1.6 (6) | 0.0 (0) | 1.3 (4) |
| 8 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 1.4 (7) | 1.5 (2) | 1.4 (5) | 0.0 (0) | 1.6 (5) |
| 79 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 1.4 (7) | 2.9 (4) | 0.8 (3) | 2.7 (3) | 0.6 (2) |
| 242 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 1.4 (7) | 0.7 (1) | 1.4 (5) | 0.9 (1) | 1.6 (5) |
| 382 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 1.0 (1) | 0.7 (1) | 1.1 (4) | 0.9 (1) | 0.6 (2) |
| 413 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 1.0 (5) | 1.5 (2) | 0.8 (3) | 1.8 (2) | 1.0 (3) |
| 9 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.8 (4) | 2.2 (3) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 1.0 (3) |
| 13 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.8 (4) | 1.5 (2) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 1.0 (3) |
| 118 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.8 (4) | 2.9 (4) | 0.0 (0) | 3.6 (4) | 0.0 (0) |
| 19 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.6 (3) | 0.0 (0) | 0.8 (3) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| 21 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.6 (3) | 0.0 (0) | 0.8 (3) | 0.0 (0) | 1.0 (3) |
| 18 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.7 (1) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 28 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.7 (1) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| 68 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.7 (1) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| 73 | Bx | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 78 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 81 | Bx | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 104 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| 394 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 1.5 (2) | 0.0 (0) | 0.9 (1) | 0.3 (1) |
| 427 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.7 (1) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.3 (1) |
| 595 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 1.5 (2) | 0.0 (0) | 1.8 (2) | 0.0 (0) |
| 11 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 14 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| 17 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| 22 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 24 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 25 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 31 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 33 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 46 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 51 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 69 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| 70 | Bx | C4T4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.0 (0) |
| 75 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 86 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 89 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 195 | AA | - | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 206 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 300 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 1.6 (5) |
| 349 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 355 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 381 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| 416 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| 467 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI01 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.6 (3) | 1.5 (2) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.6 (2) |
| CIENI02 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.6 (3) | 0.0 (0) | 0.8 (3) | 1.8 (2) | 0.3 (1) |
| CIENI03 | Bx | C4Tx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.4 (2) | 0.0 (0) | 0.5 (2) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| CIENI04 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| CIENI05 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) |
| CIENI06 | Bx | CxT4 | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |
| CIENI07 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI08 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI09 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI10 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.0 (0) | 0.3 (1) | 0.9 (1) | 0.0 (0) |
| CIENI11 | Bx | CxTx | | | | | | | | | | | | | | | | 0.2 (1) | 0.7 (1) | 0.0 (0) | 0.0 (0) | 0.3 (1) |

Fig. 3 KIR gene content diversity in a cohort of HIV-infected Mexican Mestizo individuals. Data on 511 unrelated HIV-infected individuals is shown. The presence (*shaded box*) and absence (*white box*) of 16 KIR genes lead to the identification of 65 different KIR genotypes in the study cohort. The frequency of each genotype is shown as percentage (%F) and defined as the number of individuals carrying the genotype (N) divided by the number of individuals studied in the given population. Novel genotypes described in the present study are named as CIENI# as they were typed at the Center for Research in Infectious Diseases (for its acronym in Spanish). Based on gene content, genotypes were grouped as described in “Materials and methods.” Genotype frequency between north and central-south region and between higher EUR and AMI ancestral genetic proportions of HIV-infected individuals of the present study is shown. No statistical differences were observed between groups

three genotypes included the telomeric gene cluster (CIENI02, CIENI04, and CIENI10) and one genotype the centromeric gene cluster (CIENI11) (Fig. 3).

Additionally, we looked for possible genotype and haplotype frequency differences depending on geographical region or genetic ancestry proportions. No difference was observed between genotype or haplotype frequencies between individuals from the north or central-south regions, nor in individuals with higher AMI or EUR genetic ancestral proportions. Considering geographical location, the only difference observed was with the Bx CxT4 subset, which was more frequent in individuals from the north ($p = 0.007$) (Table 3).

HLA allele and serologic motif distribution

HLA alleles and their serologic motifs were obtained for this study cohort to explore possible geographic or genetic ancestry-dependent differences that could influence HIV

control in the Mexican population. A total of 164 alleles were observed in the general cohort; 43 were HLA-A, 87 were HLA-B, and 34 were HLA-C. The most frequent HLA-A alleles in the cohort were A*02:01 (allelic frequency 0.214) and A*24:02 (0.145); the most frequent HLA-B alleles were B*40:02 (0.062), B*35:01 (0.059), B*51:01 (0.058), and B*39:05 (0.056); and the most frequent HLA-C alleles were C*04:01 (0.182) and C*07:02 (0.180) (Table S4). A*02:06, B*39:02, C*03:02, C*03:05, and C*07:02 were observed in higher frequencies in individuals with higher AMI ancestral components ($p < 0.05, q < 0.2$), while A*03:01, A*33:01, B*27:05, B*44:02, C*02:02, C*05:01, and C*07:01 were observed in higher frequencies in individuals with higher EUR ancestral proportions ($p < 0.05, q < 0.2$) (Table 4). No differences in HLA allele frequencies were observed between geographical regions. The complete list of HLA allele frequencies and their comparisons between individuals from the north and central-south or with higher AMI or EUR ancestry proportions is available in Table S4.

Bw4 motif was more frequent in individuals from the north region ($p = 0.035, q = 0.084$) and with higher EUR ancestral proportion ($p = 0.005, q = 0.048$). C2 was observed with higher frequency in the central-south region ($p = 0.039, q = 0.084$), while C1 was observed in higher frequency in individuals with higher EUR ancestral proportion ($p = 0.010, q = 0.048$) (Table 5).

Effect of KIR genetic profiles and HLA alleles on HIV pVL setpoints and CD4+ T cell counts

Given the genetic richness of the HLA and KIR loci in the Mexican cohort, and the differences observed in KIR and

Table 3 Comparison of KIR genotypes, haplotypes, and linkage groups in Mexican Mestizos from the north and central-south region and with higher European or Amerindian ancestry proportions

| | Haplogroup | | Bx Subset | | | | Gene cluster | |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | AA %F (N) | Bx %F (N) | CxTx %F (N) | CxT4 %F (N) | C4Tx %F (N) | C4T4 %F (N) | C4 %F (N) | T4 %F (N) |
| All (n = 511) | 34.6 (177) | 65.4 (334) | 20.7 (106) | 31.1 (159) | 9.2 (47) | 4.3 (22) | 13.5 (69) | 35.4 (181) |
| North (n = 137) | 29.2 (40) | 70.8 (97) | 17.5 (24) | 40.1 (55) | 10.2 (14) | 2.9 (4) | 13.1 (18) | 43.1 (59) |
| Central-south (n = 368) | 36.4 (134) | 63.6 (234) | 22.3 (82) | 27.5 (101) | 9.0 (33) | 4.9 (18) | 13.9 (51) | 32.3 (119) |
| p value | NS | NS | NS | 0.007 | NS | NS | NS | NS |
| EUR >50 % (n = 110) | 30.0 (30) | 70.0 (77) | 19.1 (21) | 38.2 (42) | 10.9 (12) | 1.8 (2) | 12.7 (14) | 40.0 (44) |
| AMI >50 % (n = 300) | 37.0 (111) | 63.0 (189) | 21.0 (63) | 32.0 (96) | 7.7 (23) | 2.3 (7) | 10.0 (30) | 34.3 (103) |
| p value | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |

NS non-significant

Table 4 Comparison of HLA allele frequencies in Mexican Mestizos from the north and central-south regions and with higher European or Amerindian ancestry proportions

| HLA Alleles | All (<i>n</i> = 511) AF(%) | North (<i>n</i> = 137) AF(%) | Central-south (<i>n</i> = 368) AF(%) | <i>p</i> value | <i>q</i> -value | EUR (>50 %) (<i>n</i> = 110) AF(%) | AMI (>50 %) (<i>n</i> = 300) AF(%) | <i>p</i> value | <i>q</i> -value |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|----------------|-----------------|---|---|----------------|-----------------|
| A*02:06 | 0.085 (16.8) | 0.066 (13.1) | 0.092 (18.2) | 0.228 | 0.603 | 0.050 (10.0) | 0.096 (19.0) | <i>0.035</i> | <i>0.190</i> |
| A*03:01 | 0.054 (10.8) | 0.084 (16.8) | 0.044 (8.7) | 0.015 | 0.325 | 0.078 (15.5) | 0.042 (8.3) | <i>0.043</i> | <i>0.190</i> |
| A*33:01 | 0.020 (3.9) | 0.022 (4.4) | 0.019 (3.8) | 0.799 | 0.795 | 0.041 (8.2) | 0.015 (3.0) | <i>0.031</i> | <i>0.190</i> |
| B*27:05 | 0.022 (4.3) | 0.026 (5.1) | 0.021 (4.1) | 0.627 | 0.747 | 0.041 (8.2) | 0.015 (3.0) | <i>0.012</i> | <i>0.190</i> |
| B*39:02 | 0.022 (4.3) | 0.026 (5.1) | 0.021 (4.1) | 0.627 | 0.747 | 0 (0.0) | 0.022 (4.3) | <i>0.024</i> | <i>0.190</i> |
| B*44:02 | 0.020 (3.9) | 0.033 (6.6) | 0.015 (3.0) | 0.075 | 0.460 | 0.041 (8.2) | 0.010 (2.0) | <i>0.006</i> | <i>0.190</i> |
| C*02:02 | 0.028 (5.5) | 0.022 (4.4) | 0.030 (6.0) | 0.662 | 0.752 | 0.059 (11.8) | 0.018 (3.7) | <i>0.004</i> | <i>0.190</i> |
| C*03:03 | 0.042 (8.6) | 0.033 (6.6) | 0.046 (9.2) | 0.376 | 0.639 | 0.018 (3.6) | 0.050 (10.0) | <i>0.043</i> | <i>0.190</i> |
| C*03:05 | 0.017 (3.3) | 0.004 (0.7) | 0.022 (4.3) | 0.051 | 0.330 | 0 (0.0) | 0.023 (4.7) | <i>0.026</i> | <i>0.190</i> |
| C*05:01 | 0.040 (7.2) | 0.051 (10.2) | 0.031 (6.3) | 0.129 | 0.517 | 0.064 (12.7) | 0.028 (5.7) | <i>0.021</i> | <i>0.190</i> |
| C*07:01 | 0.073 (14.7) | 0.073 (14.6) | 0.075 (14.9) | 1.000 | 0.898 | 0.114 (22.7) | 0.059 (11.7) | <i>0.007</i> | <i>0.190</i> |
| C*07:02 | 0.180 (35.8) | 0.146 (29.2) | 0.186 (37.0) | 0.116 | 0.517 | 0.114 (22.7) | 0.193 (38.3) | <i>0.003</i> | <i>0.190</i> |

Allelic frequency (AF) is defined as the proportion of specific HLA alleles over the total number of HLA alleles observed for the same locus. Percentage is defined as the number of individuals possessing the HLA allele divided by the total number of individuals in the cohort. Only HLA alleles with significant differences ($p < 0.05$, $q < 0.2$) for any of the comparison groups are shown

HLA gene, haplotype and serologic motif frequencies comparing the north and central-south regions or individuals with higher EUR or AMI genetic ancestry proportions, we looked for possible effects of HLA and KIR over HIV pVL setpoints, CD4+ T cell counts, and Z-scores correcting for genetic ancestry proportions and other confounding variables. An MCA considering HLA and KIR gene profiles as well as SNPs considered for ancestry genotyping showed no underlying population structure in the data, confirming that the study cohort is a genetically unbiased group (Fig. 4a, b). Indeed, the first component in the analysis only explained 3.3 % of the variance, with other components contributing even less (Fig. 4a). We then performed a multivariate analysis evaluating possible effects of HLA and KIR genes on HIV disease progression, correcting for confounders. A total of 87 associations with $p < 0.05$ were

observed with CD4+ T cell counts, pVL, or Z-score in the univariate analysis (Table S5). However, only six of these associations remained significant after correcting for multiple comparisons at $q < 0.2$. All variables with significant p value were used as confounders in the multivariate analysis. After adjustment, 24 significant associations were observed ($p < 0.05$, $q < 0.2$). Importantly, all the significant associations involved single HLA alleles. No associations with KIR genes, haplotypes, or KIR-HLA combinations were observed (Table 6). After correcting for genetic ancestry, A*01:01, B*14:02, and B*27:05 were associated with higher CD4+ T cell counts, while A*02:06 was associated with lower CD4+ T cell counts. Also, A*31:01 and C*08:01 were associated with lower HIV pVL (Table 6). Furthermore, A*01:01, B*14:02, B*27:05, and C*08:08 were all associated with higher Z-score (Table 6).

Table 5 Comparison of HLA serological motif frequencies in Mexican Mestizos from the north and central-south regions and with higher European or Amerindian ancestry proportions

| HLA serological motifs | All (<i>n</i> = 511) %F (<i>N</i>) | North (<i>n</i> = 137) %F (<i>N</i>) | Central-south (<i>n</i> = 368) %F (<i>N</i>) | <i>p</i> value | <i>q</i> -value | EUR (>50 %) (<i>n</i> = 110) %F (<i>N</i>) | AMI (>50 %) (<i>n</i> = 300) %F (<i>N</i>) | <i>p</i> value | <i>q</i> -value |
|------------------------|---|---|---|----------------|-----------------|---|---|----------------|-----------------|
| Bw4 | 45.4 (231) | 53.3 (73) | 42.4 (156) | <i>0.035</i> | <i>0.084</i> | 58.2 (64) | 42.7 (128) | <i>0.005</i> | <i>0.048</i> |
| Bw4 ^{8011e} | 31.3 (160) | 36.5 (50) | 29.6 (109) | 0.878 | 0.431 | 33.6 (37) | 31.0 (93) | 0.072 | 0.106 |
| Bw6 | 91.5 (465) | 87.6 (120) | 92.1 (339) | 0.073 | 0.110 | 87.3 (96) | 91.3 (274) | 0.245 | 0.230 |
| C1 | 55.8 (284) | 59.9 (82) | 54.3 (200) | 0.314 | 0.250 | 65.5 (72) | 50.7 (152) | <i>0.010</i> | <i>0.048</i> |
| C2 | 86.4 (440) | 80.3 (110) | 88.0 (324) | <i>0.039</i> | <i>0.084</i> | 83.6 (92) | 88.3 (265) | 0.177 | 0.179 |

Frequency (%F) of each gene is expressed as percentage and defined as the number of individuals carrying the serologic motif (*N*) divided by the number of individuals in the corresponding population subgroup. p and q -values shown in italics only for significant comparisons ($p < 0.05$, $q < 0.2$)

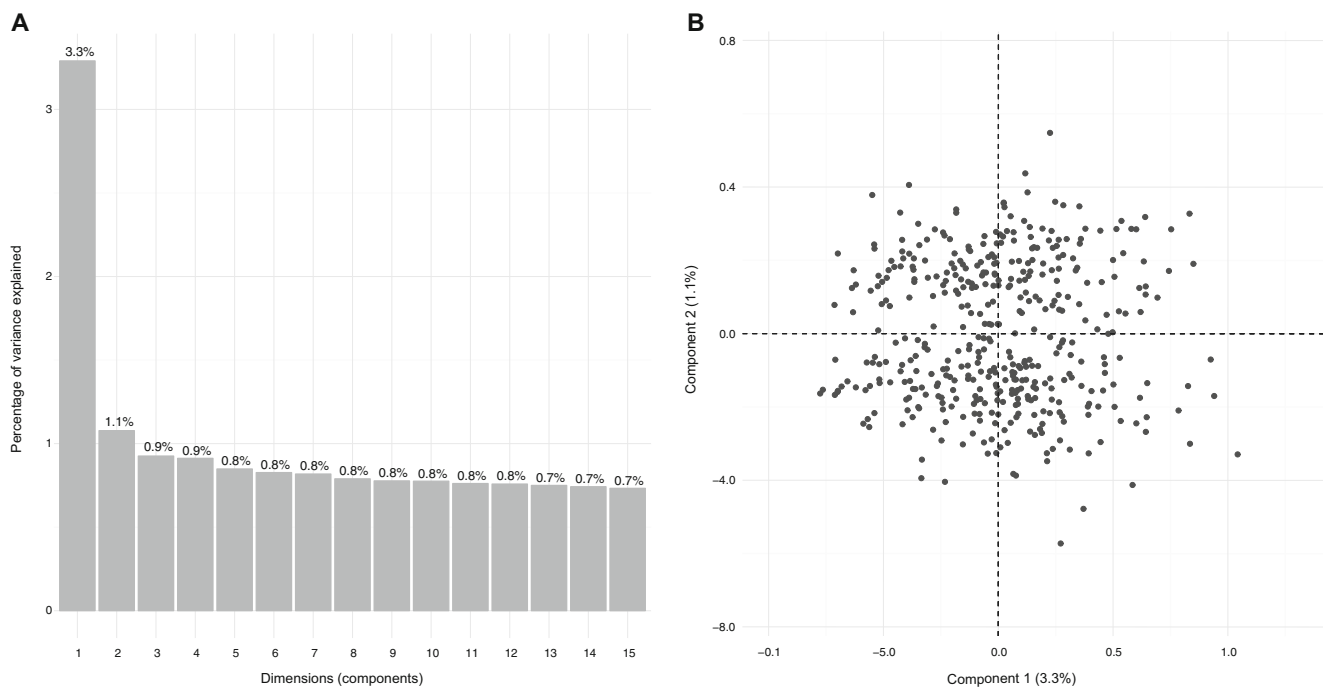


Fig. 4 Multiple Correspondence Analysis. We applied Multiple Correspondence Analysis (MCA) on all the independent genetic variables (SNPs, HLA alleles, and KIR alleles) to determine if there was some underlying population structure in the data. The MCA

revealed that our cohort is a genetically unbiased group. **a** Contribution of the first 15 components to explaining the variance of the sample. **b** Distribution of individuals according to components 1 and 2

Discussion

Much effort has been invested in detecting common genetic variants associated with HIV disease progression. However, functionally and clinically relevant variation may be rare or population specific, requiring studies on diverse human populations to identify new risk or protection factors. Currently, most of the Mexican population is admixed, including not only indigenous but also European and African gene ancestries (Moreno-Estrada et al. 2014). This characteristic provides an opportunity to look for novel disease-associated genetic factors. The present study represents the first attempt to identify the influence of genetic stratification on KIR gene profiles and HLA frequencies in a national cohort of HIV-infected Mexican Mestizos. The study cohort included individuals from the most affected states by the HIV epidemic in Mexico, with a high representation of central and southern parts of the country (Fig. 1) (CENSIDA 2014). Although sampling biases would most probably be present, our cohort is the most genetically rich and representative of the Mexican population to date aiming to describe the impact of KIR and HLA genetic diversity on HIV disease. Furthermore, genetic ancestry proportion characterization allowed exploring possible KIR and HLA gene frequency differences and specific KIR gene, HLA allele, and

KIR-HLA combination effects on HIV infection within the same population.

We observed high similarity in KIR gene and genotype distributions in the study cohort between individuals with higher EUR and AMI genetic ancestry proportions, although we observed differences when comparing individuals from the north and central-south regions (Tables 2, 3, 4, and 5). Interestingly, differences observed between regions and considering genetic stratification were more frequent in B haplotype KIR genes. B haplotypes are characterized by the presence of different proportions of activating KIR genes. The role of activating KIR in immune response is still enigmatic, although several studies have suggested that not only inhibitory KIRs play an important role on NK cell activation (Carr et al. 2007; Chewning et al. 2007; Lanier 2001). Indeed, in studies on other viral infections in Mexican individuals, activating KIRs have been implicated in protection (Aranda-Romo et al. 2012). Interestingly, our analysis did not show any KIR gene, haplotype, or genotype associated with HIV disease progression. Even the previously reported protective association KIR3DL1/HLA-Bw4^{8011e} was not observed. Although a possible lack of statistical power to detect KIR associations could exist due to a small number of individuals considered in the analyses, it could also be true that these associations are not present or are too weak to be detected in the studied immunogenetic context with a characteristic KIR-HLA combinatorial diversity. Our observations contrast with

Table 6 Genetic factors involved in HIV disease progression in Mexican Mestizos individuals

| Clinical variable | Genetic factor | Correction | Estimate ^a | <i>p</i> value | <i>q</i> -value | Confounder variables ^b | |
|------------------------------|----------------------------------|------------|-----------------------|----------------|-----------------|--|----------------------|
| CD4+ T cell count (cells/μl) | A*01:01 | KIR | 0.002 | 0.007 | 0.161 | Age; gender | |
| | | Ancestry | 0.002 | 0.007 | 0.161 | Age; gender | |
| | | HLA | 0.002 | 0.024 | 0.199 | B*27:05; B*14:02; A*02:06; A*33:01; A*02:01; B*39:01; B*27:05_C*02:02; age; gender | |
| | A*02:06 | KIR | -0.001 | 0.023 | 0.198 | Age; gender | |
| | | Ancestry | -0.001 | 0.023 | 0.198 | Age; gender | |
| | | HLA | -0.002 | 0.018 | 0.196 | A*01:01; B*27:05; B*14:02; A*33:01; A*02:01; B*39:01; B*27:05_C*02:02; age; gender | |
| | B*14:02 | KIR | 0.002 | 0.021 | 0.196 | Age; gender | |
| | | Ancestry | 0.002 | 0.021 | 0.196 | Age; gender | |
| | B*27:05 | KIR | 0.002 | 0.010 | 0.194 | Age; gender | |
| | | Ancestry | 0.002 | 0.010 | 0.194 | Age; gender | |
| | pVL setpoint (log RNA copies/ml) | A*31:01 | KIR | -0.408 | 0.014 | 0.194 | Age; gender |
| | | | Ancestry | -0.408 | 0.014 | 0.194 | Age; gender |
| HLA | | | -0.416 | 0.014 | 0.194 | C*08:01; B*40:02; B*48:01_C*08:01; age; gender | |
| C*08:01 | | KIR | -0.486 | 0.012 | 0.194 | Age; gender | |
| | | Ancestry | -0.486 | 0.012 | 0.194 | Age; gender | |
| Z-score | | A*01:01 | KIR | 0.415 | 0.021 | 0.196 | KIR2DS4; age; gender |
| | Ancestry | | 0.411 | 0.022 | 0.196 | Age; gender | |
| | HLA | | 0.435 | 0.015 | 0.194 | B*14:02; C*08:01; B*27:05; age; gender | |
| | B*14:02 | KIR | 0.435 | 0.021 | 0.196 | KIR2DS4; age; gender | |
| | | Ancestry | 0.436 | 0.020 | 0.196 | age; gender | |
| | | HLA | 0.549 | 0.006 | 0.157 | C*08:01; A*01:01; B*27:05; age; gender | |
| | B*27:05 | KIR | 0.556 | 0.019 | 0.196 | KIR2DS4; age; gender | |
| | | Ancestry | 0.538 | 0.022 | 0.197 | Age; gender | |
| | C*08:01 | HLA | 0.473 | 0.016 | 0.194 | B*14:02; A*01:01; B*27:05; age; gender | |

^a Logistic regression model

^b All significant variables ($p < 0.05$) obtained in the univariate analysis (Table S5) were used as confounders

previous studies in HIV-infected Mexican Mestizos showing higher CD4+ T cell counts in individuals presenting KIR3DS1/L1 in combination with HLA-Bw4 (Hernandez-Ramirez et al. 2015a). Nevertheless, this study was centered in assessing only the presence of the relevant KIR genes and HLA serologic motifs, without considering other genetic factors or confounders, and was conducted in a cohort of individuals from a northern state, with possibly a higher proportion of individuals with high EUR ancestry proportion compared to our cohort. Furthermore, other studies have suggested that high-resolution KIR typing (Martin et al. 2007) and the determination of KIR copy number (Pelak et al. 2011) could be important to uncover KIR-HLA associations implicated in response to infections, including HIV. A more detailed analysis of the KIR alleles or their copy number may uncover population-specific associations where the gene content analysis has not. Of note, we observed some expected associations

that support the protective effect of HLA-Bw4 and KIR3DL1 such as B*27:05 with KIR3DL1 and higher CD4/higher Z-score. Nevertheless, the significance of these associations was lost when correcting for multiple comparisons ($p < 0.05$, q non-significant in all cases).

Contrasting with KIR gene distributions, HLA allele frequencies showed marked differences between individuals with higher AMI and higher EUR ancestry proportions. As expected, typically Amerindian HLA alleles (IPD-IMGT/HLA, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/ethnicity.html> (accessed April 2016)) were observed in higher frequencies in individuals with higher AMI ancestry proportions, including A*02:06, B*39:02, and C*03:05. On the other hand, Caucasian HLA alleles (IPD-IMGT/HLA) were enriched in individuals with higher EUR ancestry proportions, including A*03:01, A*33:01, B*27:05, B*44:02, C*02:02, and C*05:01 (Table 4). Interestingly, after

correcting for genetic ancestry, the only associations with HIV disease progression that remained significant included individual HLA alleles, some of them already reported as protective genetic factors in HIV infection (B*14:02, B*27:05) (Goulder and Walker 2012). Others, however, could represent novel risk factors, such as A*02:06, a typically Amerindian HLA allele associated with lower CD4+ T cell counts and also significantly more common in individuals with higher AMI genetic ancestry proportion.

Of note, some of the KIR-HLA combinations with pre-adjusted significant *p* and *q*-values could also be of interest and represent novel associations, even when significance is lost after correction for confounding variables. Interestingly, C*08:01 was consistently associated with positive clinical outcomes (pVL, Z-score) in combination with KIR2DL5, 2DS5, and 2DS1, which are part of the 2DS1-3DS1-2DL5-2DS5 telomeric KIR haplotype. This might suggest a possible interaction between C*08:01 and 2DS5/2DL5 warranting functional assays to confirm these possible novel associations. As the significance of these associations is not maintained in the multivariate analysis, they might represent weak associations, which would not be detected with our study design.

Few populations have been studied in high depth regarding HLA and KIR frequencies and possible interactions. Our work provides a good opportunity to compare the highly admixed Mexican population with other thoroughly described populations and could give an insight on the selective evolution of KIR and HLA genes in different populations. Interestingly, a contrastingly high frequency of HLA-C2 (86.4 %) was observed in Mexicans when compared with thoroughly described native populations such as the Yucpa Amerindians (17.2 %) (Gendzekhadze et al. 2009) and the Maori and Polynesian Pacific Islanders (27.9 and 37.7 %, respectively, $p < 0.0001$) (Nemat-Gorgani et al. 2014). Also of note is the much lower prevalence of HLA-B KIR ligands in all of these native populations (9.8 % for Yucpa, 2 % for Maori, 3 % for Polynesian) compared with Mexican Mestizos (45.4 %, $p < 0.0001$ in all cases). Indeed, within the Mexican Mestizo cohort, individuals with higher AMI ancestry proportion showed lower HLA-Bw4 frequencies than individuals with higher EUR ancestry proportion. These observations suggest that KIR ligand frequencies can show highly divergent distributions among different populations, which could result in specific combinatorial diversities of KIR and HLA alleles influencing NK cell education and response to infection.

Interestingly, individuals with higher AMI ancestry proportions showed lower CD4+ T cell counts. Whether CD4+ T cell counts in non-HIV-infected individuals with higher AMI ancestry proportion are per se lower than in individuals with higher EUR ancestry proportions is unknown as no data is available. Nevertheless, this effect could also be associated with HLA alleles such as

A*02:06 or even with genetic factors other than HLA or KIR.

In the present study, we have demonstrated unique HLA and KIR gene frequency distributions in the Mexican population and we have evidenced differences in HLA alleles and KIR gene profiles between the north and central-south regions of the country and between individuals with higher EUR or AMI ancestry proportions and that these differences could be reflecting subtle differences in HIV disease outcome in the country. After correcting for genetic ancestry, only individual HLA alleles were associated with HIV disease progression with no significant KIR effects. This might suggest modest or weak KIR-HLA effects affecting HIV disease progression at the population level, which need highly powered studies to be detected. Further studies with larger sample sizes and with higher resolution KIR typing could evidence additional associations. Our results highlight the advantages of considering a detailed genetic stratification within populations when studying genetic profiles that could be implicated in disease-association studies.

Acknowledgments This work was funded by the Mexican Government (Comisión de Equidad y Género de las Legislaturas LX-LXI, Comisión de Igualdad de Género de la Legislatura LXII de la H. Cámara de Diputados) and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF; PIRIVE09-18). DGR is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; Scholarship No. 23479).

Compliance with ethical standards

Ethics statement The present study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the National Institute of Respiratory Diseases (INER). Informed written consent was obtained for every participant before blood sample donation. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

References

- Alter G et al. (2007) Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 204:3027–3036. doi:10.1084/jem.20070695
- Alvarado-Hernandez DL, Hernandez-Ramirez D, Noyola DE, Garcia-Sepulveda CA (2011) KIR gene diversity in Mexican Mestizos of San Luis Potosi. *Immunogenetics* 63:561–575. doi:10.1007/s00251-011-0540-x
- Aranda-Romo S, Garcia-Sepulveda CA, Comas-Garcia A, Lovato-Salas F, Salgado-Bustamante M, Gomez-Gomez A, Noyola DE (2012) Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in severe A (H1N1) 2009 influenza infections. *Immunogenetics* 64:653–662. doi:10.1007/s00251-012-0623-3
- Barbour JD, Sriram U, Caillier SJ, Levy JA, Hecht FM, Oksenberg JR (2007) Synergy or independence? Deciphering the interaction of HLA class I and NK cell KIR alleles in early HIV-1 disease progression. *PLoS Pathog* 3:e43. doi:10.1371/journal.ppat.0030043

- Barquera R et al. (2008) HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol* 45:1171–1178. doi:10.1016/j.molimm.2007.07.042
- Boulet S, Sharafi S, Simic N, Bruneau J, Routy JP, Tsoukas CM, Bernard NF (2008) Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS* 22:595–599. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f56b23
- Campbell KS, Purdy AK (2011) Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 132:315–325. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x
- Carr WH, Rosen DB, Arase H, Nixon DF, Michaelsson J, Lanier LL (2007) Cutting edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol* 178:647–651
- CENSIDA (2012) El VIH/SIDA en México 2012. Secretaría de Salud 2012
- CENSIDA (2014) Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA: Actualización al cierre de 2014. <http://www.censida.salud.gob.mx/interior/cifras.html>. Accessed 04 Jun 2015
- Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D (1999) The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10:661–671
- Contreras G, Alaez C, Murguía A, García D, Flores H, Gorodezky C (2007) Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. *Tissue Antigens* 69(Suppl 1):125–129. doi:10.1111/j.1399-0039.2006.76212.x
- Chewning JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B (2007) KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol* 179:854–868
- Christiansen FT, Gaudieri S, De Santis D, Witt C.S., James I.R., Mallal S. (2002) NK receptor genes are predictors of HIV progression. Paper presented at the 28th Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Nashville, TN, p 19–23
- Du Z, Sharma SK, Spellman S, Reed EF, Rajalingam R (2008) KIR2DL5 alleles mark certain combination of activating KIR genes. *Genes Immun* 9:470–480. doi:10.1038/gene.2008.39
- 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
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7:574–578. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Flores-Villanueva PO et al. (2001) Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5140–5145. doi:10.1073/pnas.071548198
- Frazer KA et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449:851–861. doi:10.1038/nature06258
- Gaudieri S et al. (2005a) Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression. *Genes Immun* 6:683–690. doi:10.1038/sj.gene.6364256
- Gaudieri S, Nolan D, McKinnon E, Witt CS, Mallal S, Christiansen FT (2005b) Associations between KIR epitope combinations expressed by HLA-B/-C haplotypes found in an HIV-1 infected study population may influence NK mediated immune responses. *Mol Immunol* 42:557–560. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.041
- Genzkehade K, Norman PJ, Abi-Rached L, Graef T, Moesta AK, Layrisse Z, Parham P (2009) Co-evolution of KIR2DL3 with HLA-C in a human population retaining minimal essential diversity of KIR and HLA class I ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18692–18697. doi:10.1073/pnas.0906051106
- Gonzalez-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 Acids Res* 39:D913–D919. doi:10.1093/nar/gkq1128
- Goulder PJ, Walker BD (2012) HIV and HLA class I: an evolving relationship. *Immunity* 37:426–440. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.005
- Goulder PJ, Watkins DI (2008) Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nature reviews Immunology* 8:619–630. doi:10.1038/nri2357
- Gutierrez-Rodriguez ME et al. (2006) KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico. *Hum Immunol* 67:85–93. doi:10.1016/j.humimm.2005.11.007
- Hernandez-Ramirez D, Esparza-Perez MA, Ramirez-Garcialuna JL, Arguello JR, Mandeville PB, Noyola DE, Garcia-Sepulveda CA (2015a) Association of KIR3DL1/S1 and HLA-Bw4 with CD4 T cell counts in HIV-infected Mexican mestizos. *Immunogenetics* 67:413–424. doi:10.1007/s00251-015-0848-z
- Hernandez-Ramirez D, Esparza-Perez MA, Ramirez-Garcialuna JL, Arguello JR, Mandeville PB, Noyola DE, Garcia-Sepulveda CA (2015b) Association of KIR3DL1/S1 and HLA-Bw4 with CD4 T cell counts in HIV-infected Mexican mestizos. *Immunogenetics*. doi:10.1007/s00251-015-0848-z
- Hollenbach JA et al. (2010) Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA. *Tissue Antigens* 76:9–17. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01459.x
- Hollenbach JA, Necedal I, Ladner MB, Single RM, Trachtenberg EA (2012) Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene content variation in the HGDP-CEPH populations. *Immunogenetics* 64:719–737. doi:10.1007/s00251-012-0629-x
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour* 9:1322–1332. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Adje-Toure CA, Vuylsteke B, Nkengasong JN, Kestens L (2006) Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol* 177:6588–6592
- Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Menten J, Vuylsteke B, Nkengasong JN, Kestens L (2011) Low CD4+ T cell counts among African HIV-1 infected subjects with group B KIR haplotypes in the absence of specific inhibitory KIR ligands. *PLoS One* 6:e17043. doi:10.1371/journal.pone.0017043
- Jiang Y et al. (2013) KIR3DS1/L1 and HLA-Bw4-80I are associated with HIV disease progression among HIV typical progressors and long-term nonprogressors. *BMC Infect Dis* 13:405. doi:10.1186/1471-2334-13-405
- Karim R et al. (2013) Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach. *AIDS* 27:1473–1481. doi:10.1097/QAD.0b013e3283601bad
- Lanier LL (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:359–393. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.359
- Lanier LL (2001) On guard—activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2:23–27. doi:10.1038/83130
- Listgarten J et al. (2008) Statistical resolution of ambiguous HLA typing data. *PLoS Comput Biol* 4:e1000016. doi:10.1371/journal.pcbi.1000016
- Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, Nixon DF, Barbour JD (2008) Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82:4785–4792. doi:10.1128/JVI.02449-07
- Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S (2013) Controlling natural killer cell responses: integration of signals for

- activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31:227–258. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075005
- Martin MP et al. (2010) HLA-Cw group 1 ligands for KIR increase susceptibility to invasive cervical cancer. *Immunogenetics* 62:761–765. doi:10.1007/s00251-010-0477-5
- Martin MP et al. (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31:429–434. doi:10.1038/ng934
- Martin MP et al. (2007) Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 39:733–740. doi:10.1038/ng2035
- Moreno-Estrada A et al. (2014) Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates native American substructure and affects biomedical traits. *Science* 344:1280–1285. doi:10.1126/science.1251688
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A (2000) Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 21:420–422
- Nemat-Gorgani N et al. (2014) KIR diversity in Maori and Polynesians: populations in which HLA-B is not a significant KIR ligand. *Immunogenetics* 66:597–611. doi:10.1007/s00251-014-0794-1
- O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM (2007) Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol* 178:235–241
- Patterson N, Price AL, Reich D (2006) Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet* 2:e190. doi:10.1371/journal.pgen.0020190
- Pelak K et al. (2011) Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control. *PLoS Biol* 9:e1001208. doi:10.1371/journal.pbio.1001208
- Pereyra F et al. (2010) The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330:1551–1557. doi:10.1126/science.1195271
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Purcell S et al. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81:559–575. doi:10.1086/519795
- Ruiz-Linares A et al. (2014) Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet* 10:e1004572. doi:10.1371/journal.pgen.1004572
- Storey JD (2002) A direct approach to false discovery rates. *J R Stat Soc Ser B* 64:479–498
- Suto Y, Maenaka K, Yabe T, Hirai M, Tokunaga K, Tadok K, Juji T (1996) Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 35:270–272. doi:10.1006/geno.1996.0355
- Tiemessen CT et al. (2011) Natural killer cell responses to HIV-1 peptides are associated with more activating KIR genes and HLA-C genes of the C1 allotype. *J Acquir Immune Defic Syndr* 57:181–189. doi:10.1097/QAI.0b013e3182174a76
- Uhrberg M et al. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7:753–763
- UNAIDS (2012) Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2012. http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/20121120_globalreport2012/
- Vales-Gomez M, Reyburn HT, Erskine RA, Strominger J (1998) Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14326–14331
- WHO 2011 WHO Global HIV/AIDS Response: Epidemic update and health sector progress towards universal access. http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/index.html
- Williams F et al. (2001) Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 62:645–650