

Tesis de Licenciatura

Estudio del polimorfismo del locus HLA-DPB1 en distintas poblaciones normales argentinas

Fernández, Gabriela C.

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández, Gabriela C.. (). Estudio del polimorfismo del locus HLA-DPB1 en distintas poblaciones normales argentinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000563_Fernandez

Cita tipo Chicago:

Fernández, Gabriela C.. "Estudio del polimorfismo del locus HLA-DPB1 en distintas poblaciones normales argentinas". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000563_Fernandez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas*

Tesis de Licenciatura

*“Estudio del polimorfismo del locus
HLA-DPB1 en distintas poblaciones
normales argentinas”*

Autor: Gabriela C. Fernández

*Directores: Marcos Leonardo Satz
Leonardo Fainboim*

*Laboratorio de Inmunogenética
Hospital de Clínicas “José de San
Martín”*

Diciembre de 1997

Nº 563 1

A la memoria de Leo Satz

*A los que más quiero: mis viejos,
mi hermana y mi cuñado;
las malengas: Pil, Flory y Guada.*

A Marcelo Pando

ÍNDICE

Pág.

1- Resumen	1
2- Introducción	3
2.1- Estructura, distribución y función	3
2.2- Organización genética y polimorfismo	8
2.3- Procesamiento y presentación antigénica	12
2.4- Evolución del MHC de clase II	14
2.4.1- Origen de los genes de clase II	14
2.4.2- Generación del polimorfismo	16
2.4.3- Mantenimiento del polimorfismo	18
2.5- HLA y genética poblacional	22
2.5.1- Desequilibrio de ligamiento	22
2.5.2- Frecuencia de los alelos DPB1 en distintas poblaciones	24
2.6- HLA y respuesta alogénica	25
2.7- Tipificación del sistema HLA	25
3- Objetivos	30
4- Materiales y métodos	31
4.1- Panel de individuos a tipificar	31
4.2- Tipificación molecular de los alelos HLA-DPB1	32
4.2.1- Extracción de ADN genómica	32
4.2.2- Amplificación por PCR	32
4.2.3- Hibridación con oligonucleótidos específicos	35
4.2.3.1- Preparación y siembra de las membranas	35
4.2.3.2- Marcación de las sondas	35
4.2.3.3- Hibridación de las membranas	35
4.3- Estudios genético-poblacionales y estadística	47
4.3.1- Cálculo de frecuencias y haplotipos	47
4.3.2- Test de Ewens-Watterson	48
4.3.3- Análisis filogenético	48
5- Resultados	51
5.1- Tipificación molecular de los alelos HLA-DPB1	51
5.2- Análisis de frecuencias	52
5.3- Análisis de haplotipos	56
5.3.1- Haplotipos más frecuentes	56
5.3.2- Desequilibrio de ligamiento	57
5.4- Test de neutralidad de Ewens-Watterson	61
5.5- Análisis filogenéticos	62
6- Discusión	66
7- Referencias	74

1. RESUMEN

La complejidad alélica de los *loci* HLA-DRB1 y DQB1 en distintas poblaciones normales argentinas ya fue estudiada en nuestro laboratorio. En el panel normal caucásico, mientras que algunos alelos están presentes en frecuencias similares a los hallados en otras poblaciones caucásicas, otros alelos tienen una frecuencia diferente, debido a una importante contribución de alelos de origen indígena. Por otra parte, en poblaciones indígenas, es de esperar una distribución de alelos propia de comunidades cerradas, tal como ocurre para otros *loci* HLA. Esto hacía pensar que la distribución de alelos DP también podría tener características distintivas en las poblaciones a ser analizadas. Para poner a prueba esta hipótesis se tipificaron los alelos del locus HLA-DPB1 por técnicas moleculares en cuatro poblaciones normales argentinas, una de individuos caucásicos con ancestros criollos, españoles o italianos, un grupo de indígenas Mapuches de una comunidad aislada de la Prov. de Neuquén (Blancura Centro), un grupo de Indígenas Chiriguano y otro de Mataco-Wichis de Orán, Salta. Los resultados demuestran que para la población caucásica argentina la distribución de los alelos DP es similar a la encontrada para otras poblaciones caucásicas, mientras que los indígenas poseen una distribución de frecuencias única y distinta, donde se observa una reducción de la variabilidad y un predominio absoluto (en todas ellas) del alelo HLA-DPB1*0402. En las poblaciones de Mapuches y Chiriguano se observaron alelos y haplotipos que posiblemente provengan de la población caucásica, la cual también muestra alguna contribución por parte de los indígenas.

Por otra parte, la historia evolutiva del locus HLA-DPB1 resulta bastante peculiar para una molécula de histocompatibilidad. Mientras que los demás *loci* mantienen su polimorfismo por mecanismos de selección equilibradora, en DP las evidencias resultan contradictorias. Utilizando un test de neutralidad aplicado a las distintas poblaciones se encontró que la homocigosis observada no se alejaba de la esperada en condiciones de neutralidad. Este resultado y la distribución de frecuencias de tipo J invertida que se obtuvo sugieren la ausencia de selección actuando sobre este locus en estas poblaciones. También se estudió el desequilibrio de ligamiento entre DQB1 y DPB1. Sólo en los caucásicos se encontraron asociaciones significativas entre estos *loci* lo que puede atribuirse a que esta población es una mezcla de individuos provenientes de diferentes poblaciones, fenómeno que puede producir desequilibrio de ligamiento.

Los estudios de las frecuencias de loci polimórficos pueden utilizarse para reconstruir la filogenia humana. Se construyeron dendogramas a partir de las frecuencias alélicas de los loci de clase II DRB1-DQB1-DPB1 para las poblaciones estudiadas aquí y otras 22 poblaciones. En los mismos se observó un grupo bien definido que contenía a todos los indígenas americanos. De las poblaciones que se analizaron en el presente estudio, los mapuches se encontraron agrupados con los indios norteamericanos como primer grupo divergente, los Chiriguano divergen luego, y los Mataco-Wichi se encuentran en un grupo junto con los Toba compartiendo un ancestro común con indios mexicanos y del centro de Brasil. Otro grupo bien establecido es el compuesto por los caucásicos, donde se observa a los argentinos muy cercanos a los italianos, más que a los españoles.

2. INTRODUCCIÓN

2.1- ESTRUCTURA, DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) son glicoproteínas que se encuentran en la superficie de las células de los vertebrados superiores. Este complejo, denominado HLA en el hombre, está codificado por un conjunto de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, es altamente polimórfico y su principal función es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T. Existen dos tipos de moléculas presentadoras de antígenos en este sistema: las de clase I y las de clase II. También se encuentran codificadas dentro del MHC otras moléculas, muchas de ellas con funciones inmunes, que se denominan de clase III.

Las moléculas de clase I están constituidas por dos cadenas, una α de aproximadamente 340 aminoácidos y un peso molecular de entre 42 y 44 kD y otra unida no covalentemente, llamada β 2-microglobulina de 99 aminoácidos y 12 kD que no se encuentra codificada dentro de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad. La cadena α se divide en tres dominios proteicos globulares de 90 aminoácidos cada uno, que son extracelulares. El que contiene el extremo N terminal se denomina α 1 y junto con el α 2 determinan el sitio de pegado del péptido o sitio de presentación antigénica; el dominio α 3 es el que se encuentra más cercano a la membrana. La cadena pesada continúa con un tramo de 40 aminoácidos hidrofóbicos que atraviesa la membrana y termina en una cola citoplasmática de 28 aminoácidos hidrofílicos donde se encuentra el extremo C terminal. El dominio α 3 y la β 2-microglobulina poseen homología estructural con los dominios constantes de las inmunoglobulinas. En los dominios α 2 y α 3 encontramos puentes disulfuros intracatenarios que estabilizan la molécula [fig. 1].

Al igual que las moléculas de clase I, las de clase II también poseen dos cadenas, una α de 229 aminoácidos (32-34 kD) y una β de 237 aminoácidos (28-29 kD), pero en este caso ambas se encuentran codificadas dentro del MHC. Cada una de estas cadenas posee dos dominios globulares externos, un segmento transmembrana de 21 residuos hidrofóbicos y un segmento citoplasmático de longitud variable según el producto, de entre 8-18 aminoácidos que contiene el extremo C terminal. Los dominios más externos de las cadenas α y β se denominan α 1 y β 1 respectivamente y son los involucrados en la presentación del antígeno;

de la misma manera, a los dominios más cercanos a la membrana se los conoce como $\alpha 2$ y $\beta 2$. Los dominios $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ poseen puentes disulfuros intracatenarios y ambas cadenas se encuentran unidas no covalentemente [fig. 1].

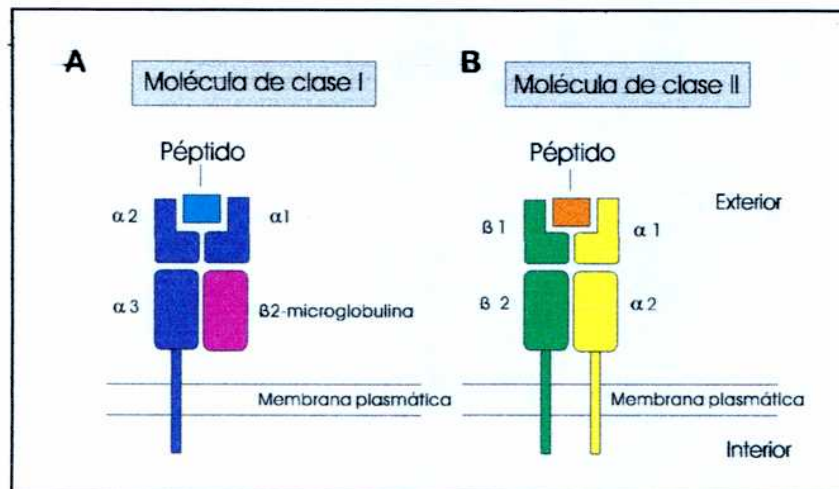


Figura 1: Esquema de la estructura de las moléculas de histocompatibilidad. A) Molécula de clase I. Se muestran la cadena pesada con los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que forman el sitio del pegado del péptido y el dominio $\alpha 3$ que junto con la β -2 microglobulina están más cercanos a la membrana de la célula. B) Molécula de clase II. Los dominios más externos donde el péptido se acomoda lo constituyen los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la cadena α y β respectivamente. Los dominios más internos son los correspondientes a $\alpha 2$ para la cadena α y $\beta 2$ para la cadena β . Se puede observar la similitud de estructura de ambas moléculas.

La estructura cristalográfica de algunas de las moléculas de clase I y II han sido determinadas [1-3]. A grandes rasgos la estructura tridimensional de ambos tipos de moléculas es muy similar. Los dominios más externos interaccionan con el péptido (el $\alpha 1$ y $\alpha 2$ para clase I y el $\alpha 1$ y $\beta 1$ para clase II) y forman el llamado sitio de reconocimiento antigénico (ARS) que posee una estructura de tipo fosa acanalada. Así pudo determinarse que tanto para clase I como para clase II, está constituido por ocho láminas β antiparalelas como piso de esa fosa y por dos regiones α hélices antiparalelas que constituyen las paredes [fig. 2]. Sin embargo, existen diferencias entre estas regiones en los dos tipos de moléculas presentadoras de antígenos que explican la razón por la cual, al estudiar los péptidos eluidos de moléculas de clase I y clase II purificadas, se encontró que para las primeras los péptidos son cortos, de exclusivamente nueve aminoácidos, mientras que para las segundas, los péptidos presentados varían en su longitud desde 15 a 24 aminoácidos [4, 5]. Estas diferencias radican en los extremos de la fosa a nivel de las regiones helicoidales, donde las moléculas de clase I presentan una estructura secundaria tal que estos extremos se encuentran

cerrados, mientras que en clase II se dejan los extremos más abiertos de manera que el péptido pueda colgar fuera de la fosa y, por lo tanto, tener menos restricciones en cuanto a su longitud. Estas diferencias a nivel de estructura secundaria están dadas por un grupo específico de aminoácidos conservados (presentes en las moléculas de clase I) cuyas cadenas laterales contribuyen a cerrar el sitio de presentación antigénica, que no se encuentran en las moléculas de clase II.

A su vez, el sitio de unión con el péptido presenta una serie de bolsillos donde ocurre la interacción molécula de histocompatibilidad-cadenas laterales de ciertos aminoácidos del péptido. En las moléculas de clase I encontramos seis bolsillos (llamados A, B, C, D, E y F), de los cuales el A y el F son bastante conservados y unen respectivamente los extremos amino y carboxi terminales de los péptidos. Las cadenas laterales de otras posiciones del péptido se acomodan en otros bolsillos y la naturaleza polimórfica de los mismos (que da lugar a los distintos alelos) determina qué péptidos se unen específicamente a esa molécula. Así, en clase I, el péptido está anclado por sus extremos y su parte central protruye hacia el exterior interactuando con el TCR. En las moléculas de clase II se ha descrito la existencia de cinco bolsillos polimórficos [1], donde también existen interacciones con el péptido a nivel de algunas cadenas laterales. Entonces, en la presentación antigénica habrá restricciones de tamaño y de secuencia, es decir, habrá péptidos que podrán ser presentados por moléculas de clase II y no de clase I (restricción por tamaño), pero a su vez, según la secuencia aminoacídica del péptido, el mismo podrá interactuar con algún tipo de molécula de clase II (DR, DQ o DP), y específicamente con algún alelo (restricción por secuencia). Sin embargo, existe un fenómeno de promiscuidad, donde un mismo péptido puede ser presentado por varias moléculas distintas de clase II. Por otra parte, una misma molécula de histocompatibilidad podrá presentar un conjunto de péptidos distintos que, por supuesto, cumplan con las restricciones pertinentes para esa molécula. Este sistema tan complicado permite a nivel individual, que algún antígeno de un determinado patógeno pueda, casi siempre, ser presentado por alguna molécula de histocompatibilidad, asegurándose una respuesta inmune adecuada que proteja al individuo. Por otra parte, a nivel poblacional, la aparición o introducción de variantes nuevas de patógenos podrá ser combatida, ya que existe en la población gran variabilidad de moléculas de histocompatibilidad y seguramente existirá la variante alélica capaz de presentar algún péptido antigénico del patógeno.

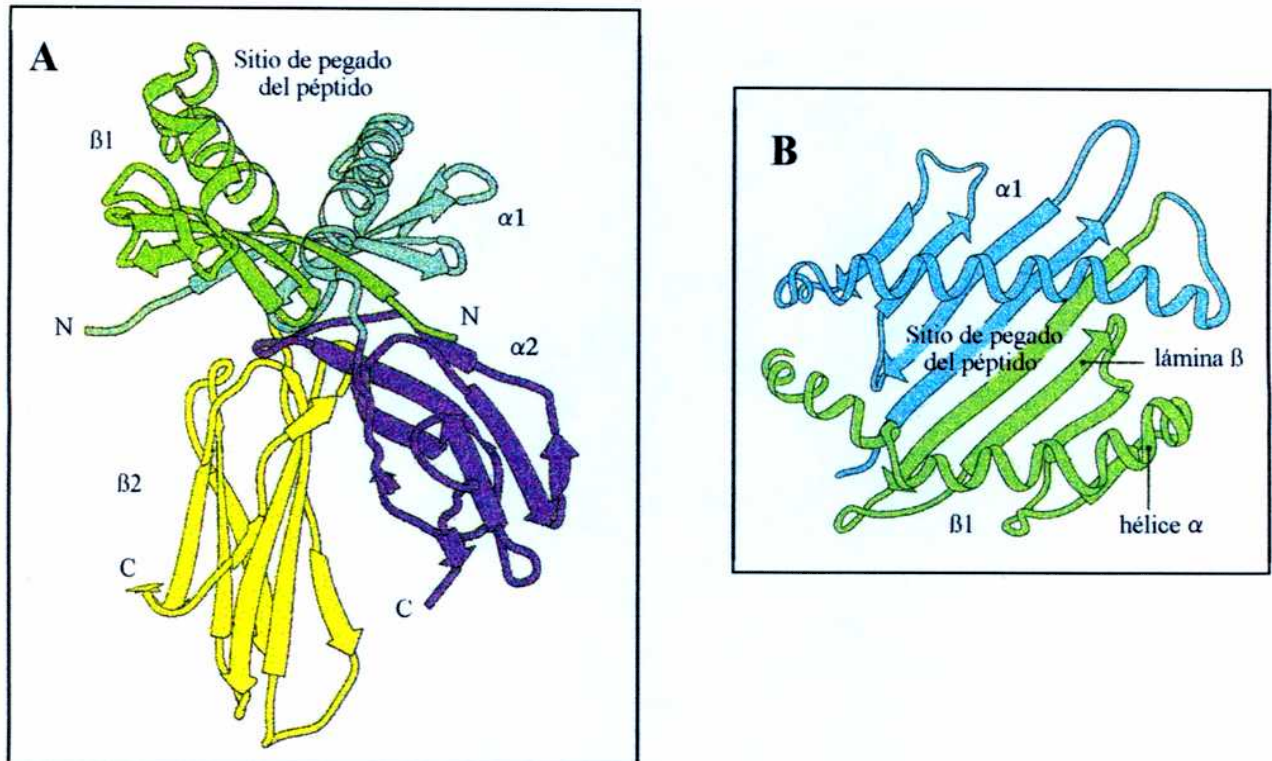


Figura 2: A) Diagrama de cintas de la estructura de una molécula de clase II determinada por cristalografía de rayos X. Se indica el sitio de pegado del péptido y los dominios correspondientes a las cadenas α y β . B) Sitio de presentación antigénica de una molécula de clase II según la interpretación de los estudios cristalográficos, mirando la molécula desde arriba, tal como sería vista por el receptor T. Se puede ver que el piso de la fosa de presentación está formado por cuatro láminas β de cada cadena y los bordes por dos α hélices, uno de cada cadena. Las moléculas de clase I poseen una estructura similar. Sin embargo, en estas moléculas el sitio de presentación antigénica está más cerrado en ambos extremos.

Los productos de los genes de clase I con funciones de presentación antigénica que se expresan en todas las células, a excepción de los glóbulos rojos y el sincicio trofoblasto, son tres y se denominan en el hombre HLA-A, HLA-B y HLA-C. Para cada una de estas moléculas la cadena α está codificada dentro del complejo mayor de histocompatibilidad por un gen diferente (el A para el HLA-A, el B para el HLA-B y el C para el HLA-C) pero todas comparten la misma cadena $\beta 2$ -microglobulina. La expresión de estas moléculas en la superficie de las células es codominante, es decir, una célula posee los tres tipos de moléculas en su membrana al mismo tiempo.

Para las moléculas de clase II también encontramos una expresión codominante, pero en este caso la misma se restringe a linfocitos B, monocitos, células dendríticas, precursores

eritroides, células de Langerhans, epitelio tímico, células de Kupffer y linfocitos T activados. Su expresión puede inducirse por interferón gama en linfocitos T, células NK, células del endotelio vascular, keratinocitos, melanocitos, astrocitos y fibroblastos [6]. Los productos de los genes de clase II (llamados colectivamente antígenos del locus D) son el HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, cada uno formado por sus dos cadenas α y β . Así, encontramos los heterodímeros DR α /DR β , DQ α /DQ β y DP α /DP β codificados por los genes DRA/DRB, DQA/DQB y DPA/DPB respectivamente. En el caso de DR existe más de un gen que codifica para la cadena β aunque todos comparten la misma cadena α (se discutirá más adelante).

La función biológica de las moléculas de histocompatibilidad, como se mencionó anteriormente, es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T, lo que desencadenará algún tipo de respuesta inmune. El receptor T (TCR) interactúa con los dominios más externos y más polimórficos de las moléculas de histocompatibilidad y con el péptido. Las moléculas accesorias CD8 de los linfocitos T citotóxicos o CD4 de los linfocitos T helper sobre la célula T también están involucradas en el reconocimiento antigénico interactuando con los dominios más conservados de las moléculas de histocompatibilidad de clase I y clase II respectivamente [fig. 3]. Esta interacción estabilizaría el contacto célula T-célula presentadora de antígeno y jugaría un papel importante en la transducción de señales en el linfocito T.

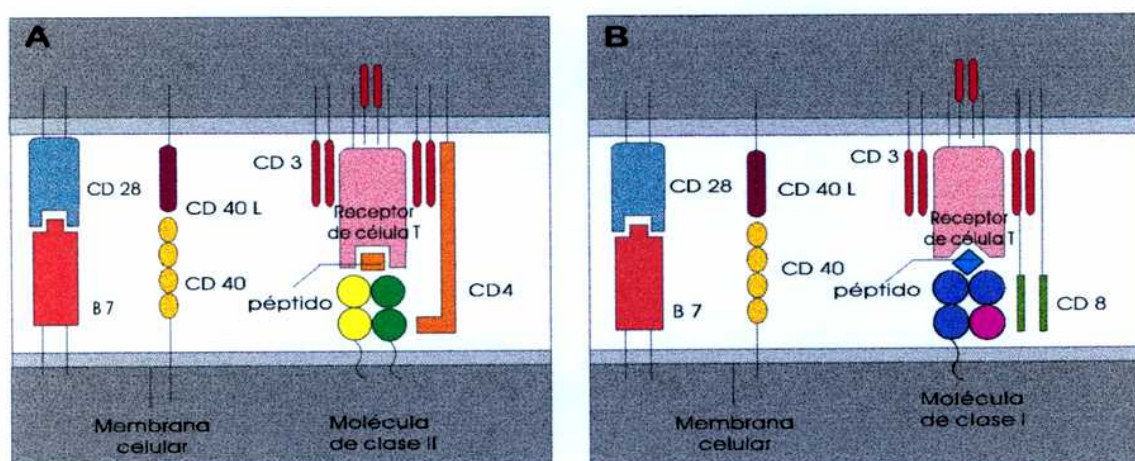


Figura 3: Interacción entre el receptor T y el complejo péptido-molécula de histocompatibilidad de clase I (A) o de clase II (B). Las moléculas accesorias CD4 del linfocito T helper y CD8 del linfocito T citotóxico interactúan con los dominios más conservados de las moléculas de clase II y clase I respectivamente. También se muestran otras moléculas accesorias necesarias para la activación del linfocito T (complejo CD3, CD40 y su ligando y B7-CD28).

2.2- ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y POLIMORFISMO.

El sistema MHC del hombre se encuentra en el brazo corto del cromosoma seis y su longitud se estima en 4×10^6 pares de bases. Este sistema puede ser dividido en tres regiones: la de clase I, la de clase II y la de clase III [fig. 4]. Al conjunto de genes ligados asociados con un genoma haploide se lo denomina haplotipo. Así, el haplotipo HLA de un individuo lo constituyen los genes ubicados en esta región del cromosoma seis que usualmente se heredan en bloque de cada progenitor.

La región de clase I se encuentra ubicada en el extremo telomérico del sistema HLA, está distribuída en unas 2000 kb y comprende unos 100 genes. Los genes de clase I constituyen una familia multigénica de más de 40 miembros, que poseen una secuencia nucleotídica similar, para muchos de los cuales se desconoce la función. Los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C que codifican para las cadenas pesadas de las moléculas de clase I con funciones de presentación antigénica se encuentran en esta región. Otros genes de clase I han sido caracterizados. HLA-E se expresa en altos niveles en linfocitos T en reposo, eosinófilos, linfocitos B, piel y en menor proporción en hígado y placenta. HLA-F se encuentra en baja proporción en hígado y timo fetal, linfocitos T, líneas celulares B y piel. La expresión de HLA-G está restringida a la placenta, donde se encuentra en muy alta proporción, y jugaría un rol importante en los fenómenos inmunes de la gestación [7]. HLA-H y HLA-J constituyen algunos de los pseudogenes de clase I que se ubican en esta región.

La región de clase II está ubicada entre el centrómero y la región de clase III, abarca unas 1000 kb y comprende unos 32 genes. Esta región puede ser subdividida en cuatro regiones empezando desde el centrómero: DP, DN/DO, DQ y DR. En la mayoría de los casos cada una de estas subregiones contiene más de un gen B y más de un gen A. Los heterodímeros que usualmente se expresan están formados por una cadena α y una cadena β de la misma región, codificadas por alguno de estos genes A y B respectivamente. Así, en la región DP existen dos pseudogenes, DPA2 y DPB2, y los genes funcionales DPA1 y DPB1, que codifican para la molécula HLA-DP. El gen DN codifica para una cadena α que junto con la cadena β codificada por el gen DO forman la molécula de clase II denominada HLA-DO. La expresión de esta molécula se restringe al timo y las células B y si bien su papel biológico en el sistema

inmune se desconoce, se sabe que impide la liberación del CLIP y el cargado del péptido de la vía exógena, ambos fenómenos mediados por la molécula HLA-DM. En la región DQ se encuentran los pseudogenes DQA2, DQB2 y DQB3 y los genes DQA1 y DQB1. En la región DR la situación es un poco más complicada. Si bien hay un sólo gen que codifica para la cadena α , el gen DRA1, existe más de un gen DRB. El gen DRB1 se encuentra presente en todos casos; no obstante, la presencia de otros genes DRB (DRB3, DRB4 y DRB5) depende del haplotipo particular del individuo. Por lo tanto, además del heterodímero codificado por los genes DRA1 y DRB1 pueden expresarse otros, que son producto del mismo gen DRA1 pero con una cadena β proveniente de diferentes genes DRB. También en la región DR encontramos algunos pseudogenes, como son el DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 y DRB9. Otros genes que mapean en la región de clase II están involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos por moléculas de clase I (Lmp2, Lmp7, TAP1 y TAP2) y por moléculas de clase II (DMA y DMB).

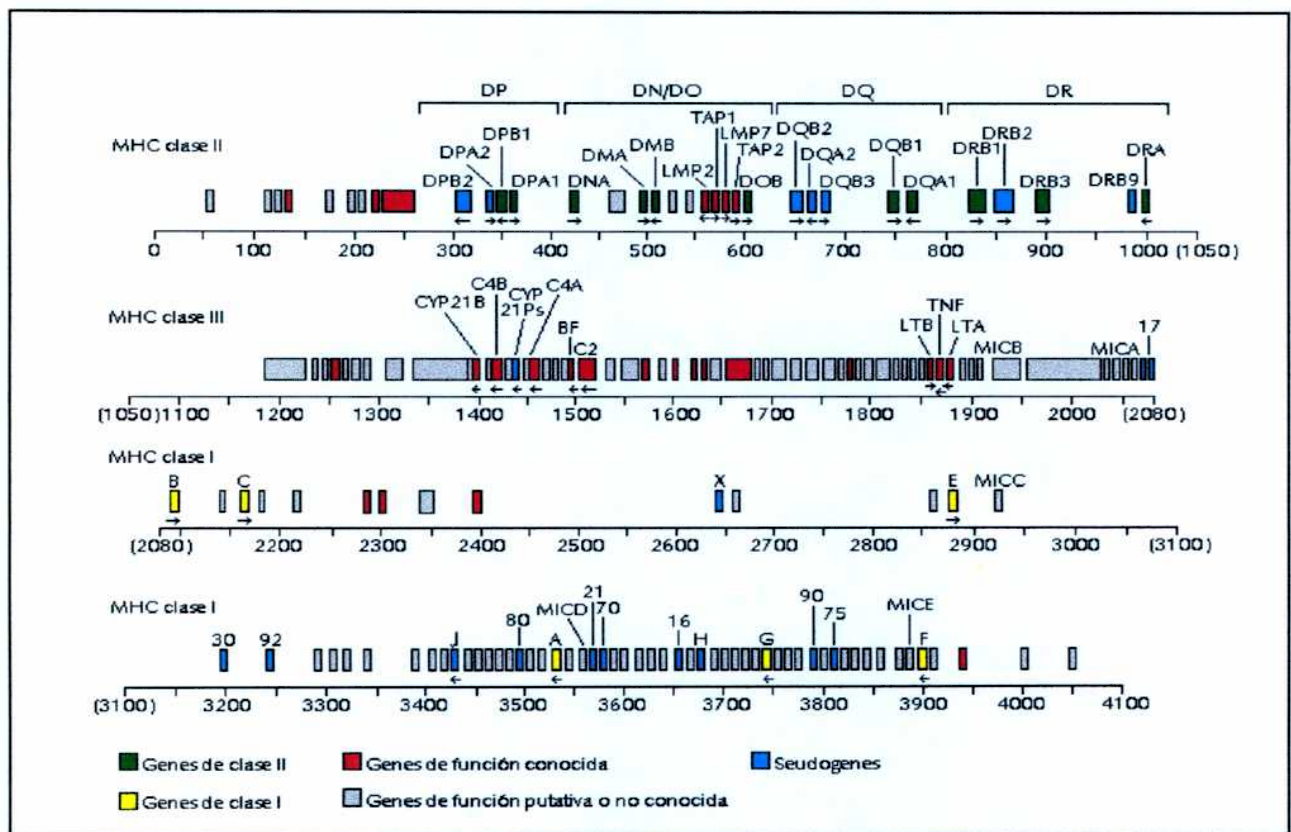


Figura 4: Mapa de la región HLA. Se muestran la organización de las regiones de clase I, II y III, con las distancias genéticas en miles de pares de bases (kb). La mayoría de los genes se mencionan en el texto. Los genes 17, 30, 92, 80, 21, 70, 16, 90, 75 poseen secuencias similares a los genes de clase I aunque son pseudogenes. La función de muchos genes de esta región se desconoce. Las flechas indican el sentido de transcripción. Nótese que en la región de clase II los genes DR y DQ se transcriben cabeza-cabeza mientras que DP lo hace cola-cola.

La región de clase III se localiza entre las regiones de clase I y clase II y comprende unas 1000 kb. Si bien los 64 genes codificados dentro de esta región no intervienen en el procesamiento y presentación antigénica, muchos de ellos desempeñan funciones inmunes. Así, encontramos los genes que codifican para las citoquinas TNF α y TNF β (linfotoxina), los que codifican para los componentes del sistema del complemento C2, C4A, C4B y el factor B. También encontramos otros genes que no poseen funciones inmunes como ser CYP 21 B, que codifica para la 21-hidroxilasa, enzima que interviene en la síntesis de esteroides.

Los genes de clase I están constituidos por siete exones. El primer exón codifica para el péptido señal; los exones 2, 3 y 4 codifican para los dominios alfa 1, 2 y 3 respectivamente, el exón 5 para el segmento transmembrana y los exones 6 y 7 para el intracitoplasmático. Los genes de clase II alfa y beta presentan 4 y 5 exones respectivamente. Para la cadena alfa el primer exón codifica el péptido señal y cuatro residuos del primer dominio; el exón 2 codifica el resto del dominio alfa 1 y el tercer exón el dominio alfa 2; el exón cuatro codifica los segmentos transmembrana e intracitoplasmático. En el gen beta de clase II los exones 1, 2 y 3 codifican para el péptido señal, el dominio beta 1 y el dominio beta 2 respectivamente; el exón 4 codifica el segmento transmembrana y parte del intracitoplasmático y el exón 5 el resto de este segmento [fig. 5].

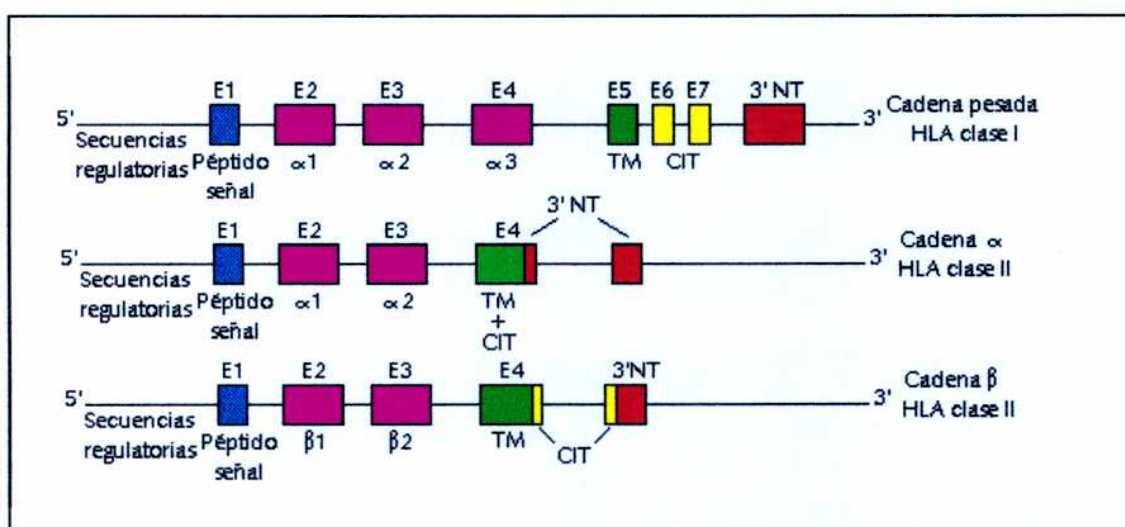


Figura 5: Organización estructural de los genes de clase I (cadena α) y de clase II (cadena α y β). Se esquematizan los exones (E1, E2, etc.) e intrones, y en la parte inferior de cada exón se determina a que dominio en la molécula corresponde. TM: transmembrana; CIT: intracitoplasmático; 3' NT: segmento 3' no traducido.

Una de las principales características de las moléculas presentadoras de antígenos es su elevado polimorfismo, es decir, la existencia de variantes alélicas para cada locus. La magnitud del mismo se determina por métodos de tipificación (los cuales se discuten más adelante); de esta manera se han descrito hasta el presente 85 alelos para el locus A, alrededor de 188 para el B y 44 para el C; en los loci de clase II también encontramos un alto grado de polimorfismo, que es mayor en las cadenas β . Así, para la cadena α , encontramos dos variantes en DRA1, 18 en DQA1 y 10 en DPA1, mientras que existen unos 221 alelos para el locus DRB1, 32 para DQB1 y más de 70 para DPB1 [8]. De esta manera, un individuo portará en una célula, digamos un monocito, las tres moléculas de clase I y las tres de clase II, pero a su vez, para cada una de ellas podrá expresar dos alelos distintos (uno heredado del padre y otro de la madre), es decir, ser heterocigota para todos los loci, con lo cual esa célula expresará como mínimo 12 moléculas de histocompatibilidad distintas en su superficie. Este hecho implica que dos individuos no relacionados tendrán muy poca probabilidad de portar el mismo conjunto de alelos de clase I y II, un aspecto que debe tenerse en cuenta al realizar transplantes de órganos, sobre todo de médula ósea.

Tanto para clase I como para clase II, el polimorfismo está concentrado en las regiones que se encuentran en contacto con el antígeno, es decir, los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ para clase I (exones 2 y 3) y en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ para clase II (exón 2 de las cadenas alfa y beta). A su vez, dentro de estos dominios las variaciones distintivas de los alelos se encuentran en ciertas posiciones características de cada locus, llamadas regiones hipervariables (HVR). Por ejemplo, para el locus DPB1 existen seis regiones de variabilidad: la región A está determinada por los codones 8 a 11, la región B por los codones 33 a 36, la C comprende desde el codón 55 al 57, la D desde el 65 al 72, la E está constituida por los codones 76 al 79 y la región F comprende los codones 84 a 87 [9]. Para DPB1, a diferencia de lo que ocurre en otros loci, no existen secuencias únicas o distintivas para cada alelo sino que la diversidad alélica es el resultado de diferentes combinaciones de regiones hipervariables (**fig. 10**).

2.3- PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

El procesamiento y presentación antigénica varía para las distintas moléculas del MHC [fig. 6]. Mientras que las moléculas de clase I presentan péptidos derivados de cualquier proteína citosólica (vía endógena o biosintética), ya sea de proteínas celulares normales o virales (en el caso que la célula este infectada), en las de clase II los péptidos presentados provienen de proteínas exógenas que entran en la célula por endocitosis (vía exógena o endocítica) [10]. Si bien ambos tipos de moléculas de histocompatibilidad se sintetizan en el retículo endoplasmático, el camino que seguirán para cargarse con el péptido y dirigirse a la membrana es diferente.

En la vía endógena las proteínas citosólicas son procesadas a péptidos por un complejo proteico multicatalítico, denominado proteasoma, que consta de 15 a 20 subunidades, entre las que se encuentran los productos de los genes Lmp2 y Lmp7. Los péptidos generados de esta manera son transportados (de manera ATP dependiente) al retículo endoplasmático por un heterodímero producto de los genes TAP1 y TAP2. Por otra parte, la molécula de clase I recién sintetizada debe asociarse con la subunidad β 2-microglobulina y con el péptido adecuado como tercera subunidad para su correcto plegamiento y estabilidad. La unión a la β 2-microglobulina ocurre en el retículo y tiene como chaperona a la calnexina que se mantiene unida hasta que el péptido es cargado. El heterodímero cadena α - β 2-microglobulina se asocia con el transportador TAP, el cual le transferirá el péptido con la intervención de otra chaperona. Las moléculas correctamente plegadas y cargadas con el péptido son exportadas a la membrana. Las que no se han asociado con la β 2-microglobulina o con el péptido son degradadas en un subcompartimiento del retículo.

En la vía exógena las cadenas α y β se unen en el retículo endoplasmático por medio de la calnexina, e inmediatamente se asocian con un polipéptido, llamado cadena invariante, que actúa como chaperona en el plegamiento de la molécula de clase II, previene que el sitio de unión del péptido sea ocupado, e interviene en el transporte hacia el lugar donde mayormente ocurre el cargado del péptido, el denominado compartimiento de clase II. La mayor parte de la cadena invariante es removida por proteasas antes de la llegada de la molécula a este compartimiento pre-lisosomal. Sólo queda unida una pequeña parte, denominada CLIP,

ocupando el sitio de unión al péptido. Las moléculas HLA-DM, heterodímero α/β codificado por los genes DMA y DMB, también se acumulan en el compartimiento de clase II y catalizan la remoción dependiente del pH del CLIP, lo que permite la subsiguiente unión del péptido. Los mismos provienen de proteínas endocitadas que son procesadas en los endosomas tempranos y tardíos por proteasas como la cathepsina B y D. Una vez cargada con el péptido la molécula de clase II es transportada a la membrana de la célula.

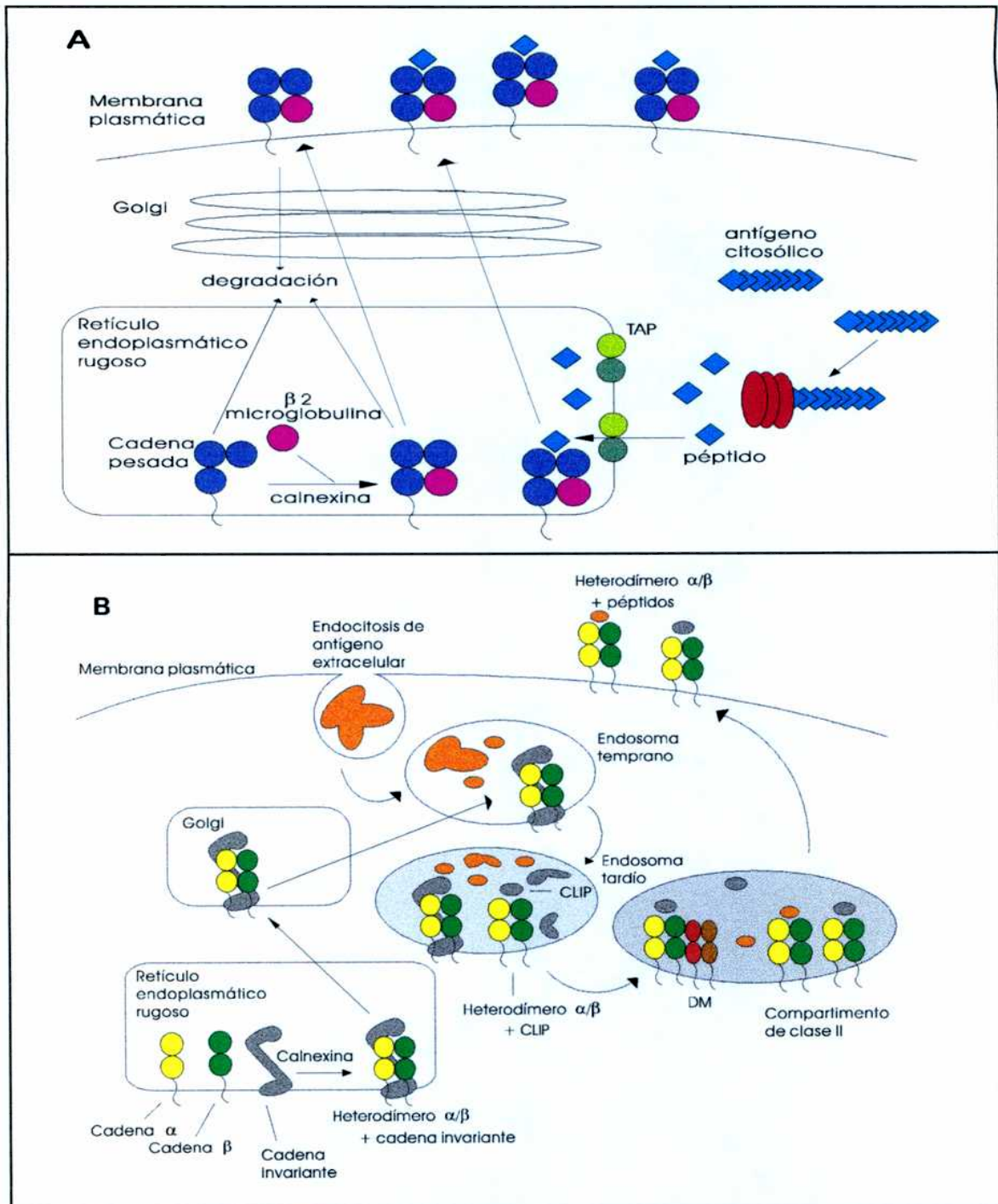


Figura 6: Vías de ensamblaje, unión del péptido y expresión en la superficie celular de las moléculas de clase I (A) y de clase II (B). Ver texto para discusión.

2.4- EVOLUCION DEL MHC DE CLASE II.

Al hablar de la evolución del MHC deben considerarse dos aspectos distintos: el origen de los genes y el del polimorfismo. En primer lugar se tratarán los aspectos referentes a la aparición de los genes y luego los concernientes al polimorfismo. Se resumirá brevemente lo que se conoce hasta el momento para los distintos loci de clase II, centrándose en DPB1. La **figura 7** muestra un árbol filogenético de las especies de primates superiores y el tiempo aproximado de divergencia, que será necesario para comprender la posterior discusión.

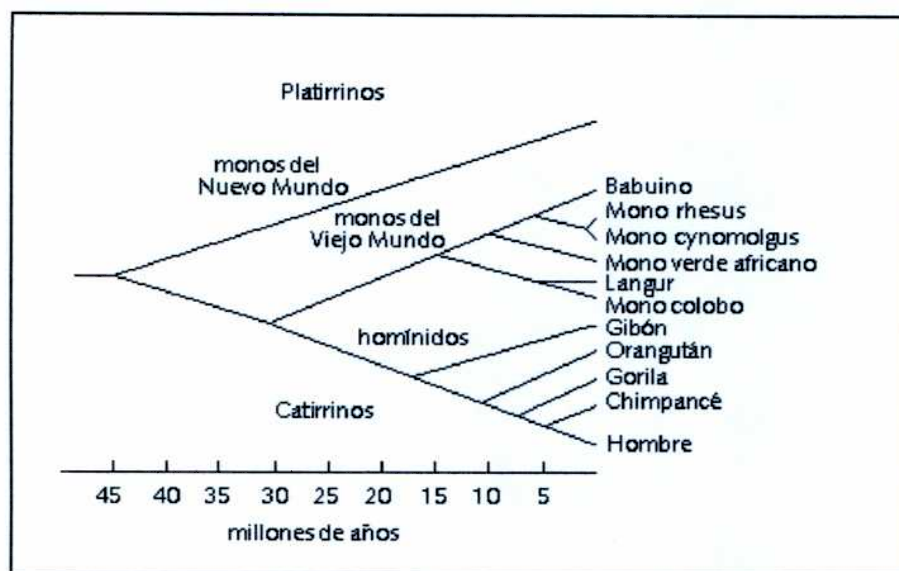


Figura 7: Árbol filogenético de las especies de primates superiores y su aproximado tiempo de divergencia (en millones de años).

2.4.1 - ORIGEN DE LOS GENES DE CLASE II.

Los diferentes genes de clase II surgieron por duplicación. El orden de aparición de los mismos en este proceso se obtiene comparándolos en cuanto a los tiempos de divergencia. Así, los genes A y B divergieron de un gen ancestral hace aproximadamente 400 millones de años (m.a.), DOB hace 200 m.a., DRB hace 150 m.a. y DQB y DPB hace 125 m.a [11]. Los distintos loci sufrieron, luego, expansiones que originaron nuevos genes. Por ejemplo, por estudios filogenéticos se ha determinado que los diversos genes DRB surgieron (por duplicación a partir del gen DRB ancestral) luego de la radiación de los mamíferos y tuvieron expansiones independientes en distintos grupos. De esta manera, de los nueve loci DRB

existentes en el hombre, ocho han sido encontrados en otros primates no humanos, aunque los monos del Nuevo Mundo poseen un set propio y más limitado de estos genes. Esto implica que las duplicaciones que generaron los genes DRB ocurrieron poco después de la separación Platyrrinos-Catarrinos (hace aproximadamente 45 m.a.) y en ambas ramas la expansión fue diferente [12,13].

El gen DQA2 sólo se ha encontrado en las especies hominoideas y es, en consecuencia, el resultado de una duplicación (a partir del gen DQA ancestral) que ocurrió antes de la divergencia de los homínidos [14]. En cambio DQB2 ha sido encontrado en los homínidos pero también existe un gen muy similar en los monos del Nuevo Mundo. Resulta un poco extraño, sin embargo, que los monos del Viejo Mundo posean una sola copia del gen DQB. Esto puede ser interpretado de dos maneras diferentes: la primera implica que el origen del DQB2 (generado por duplicación a partir del gen DQB ancestral) es presumiblemente anterior a la separación Platyrrinos-Catarrinos y se ha perdido en la rama de los monos del Viejo Mundo; la segunda que por lo menos es anterior a la divergencia de los homínidos [15].

Árboles filogenéticos realizados con los exones 2 y 3 de los genes de clase II (tanto para la cadena α como para la cadena β) de distintas especies de mamíferos revelan un aspecto muy interesante respecto al origen de DP. Entre los genes A, los loci DR y DP forman un clado, mientras que para los genes B, son DQ y DP los que constituyen un clado. Esto significa que la región DP ancestral deriva por duplicación, para el gen B de DQB y para el gen A de DRA. Por otra parte, este origen tan inusual pudo haber generado la orientación cola-a-cola que posee el locus DP, única en los genes de clase II. Dos posibles escenarios por los cuales esta región híbrida de clase II pudo haberse originado se muestran en la **figura 8**. Si los genes A y B fueron translocados a la región DP por eventos separados, ambos deben haberse invertido cuando tuvo lugar la translocación o en algún momento posterior. En el otro posible escenario, los genes A y B fueron invertidos y translocados al mismo tiempo. En este mismo estudio, los resultados sugieren que los actuales pseudogenes DPA2 y DPB2 surgieron por duplicación a partir de DPA1 y DPB1 respectivamente, pero en eventos separados en el tiempo. DPB2 parece haberse originado en los primates, mientras que el origen de DPA2 precede la radiación de los mamíferos [11]. La organización de la región DP se ha mantenido prácticamente igual desde hace por lo menos 45 m.a. Esto incluye la longitud de la región, el

mapa de restricción, el número, posición y organización exónica-intrónica de los genes, aspectos que han sido conservados desde la separación Placirrinos-Catirrinos [16].

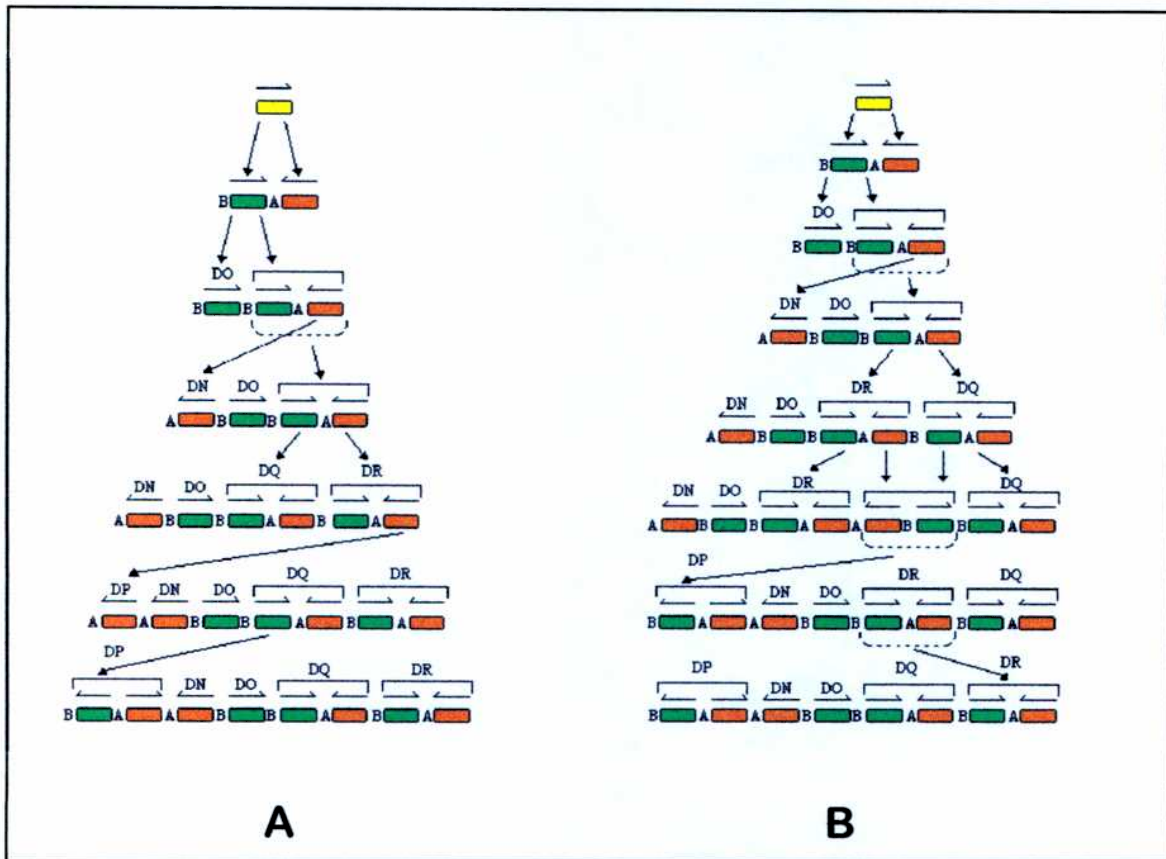


Figura 8: Serie de eventos hipotéticos que dieron lugar a la región de clase II, ilustrando dos vías posibles del origen de DP, a partir de los genes DQB y DRA. A) Vía con dos eventos de duplicación-inversión independientes. B) Vía con un único evento de duplicación [9].

2.4.2- GENERACION DEL POLIMORFISMO

Como se mencionó anteriormente, el polimorfismo es uno de los aspectos más destacables de las moléculas de histocompatibilidad. Al comparar las secuencias de regiones polimórficas en especies separadas por tiempos evolutivos de entre 5 a 10 millones de años (como por ejemplo el chimpancé y el humano), se observa que existe una clara similitud en cuanto a la homología de secuencia en muchos de los alelos entre las especies en cuestión [17]. Más aún, estas similitudes son observadas, también, entre humanos y bovinos [18], entre humanos y roedores y entre aves y mamíferos, siendo los resultados más confusos cuando se incluye a los peces en el análisis. Una vez descartada la convergencia como explicación de estas

semejanzas [19], el análisis revela que el polimorfismo se hereda como parte de la diversidad genética de los fundadores de las nuevas especies. En otras palabras, esta hipótesis, llamada transespecie, implica que el polimorfismo es, no exclusivamente pero si en su mayoría, derivado de especies ancestrales y no generado en cada especie independientemente, y que ciertos alelos de diferentes especies (linajes alélicos) pueden estar más relacionados entre si que otros dentro de la misma especie. Como una consecuencia de esto, uno esperaría que los miembros de linajes alélicos transespecíficos se agrupen juntos en árboles filogenéticos contruidos a partir de las secuencias nucleotídicas de los alelos de las diferentes especies. Esta persistencia de alelos en el tiempo implica la existencia de mecanismos selectivos positivos que no permiten la pérdida de los linajes alélicos a través de los sucesivos eventos de especiación.

Así, para el locus DRB1, los estudios indican que el polimorfismo surge por el mismo tiempo en que surgen los demás genes DRB (hace 45 m.a.), y persiste a través de todos los eventos de especiación que ocurren en la evolución de los Catirinos [12].

En DQ el polimorfismo de los genes DQA1 y DQB1 se originó hace más de 30 m.a. y es heredado en forma transespecífica. Sin embargo, si bien para DQB1 el origen de nuevos alelos parece estar mediado (en su mayoría) por mecanismos de recombinación intragénica (ver más adelante) [14], para DQA1 la generación de diversidad alélica ocurre principalmente por mutación puntual [15].

Para el locus DPA1, parte del polimorfismo tiene también un carácter transespecífico, con linajes alélicos que se han mantenido durante 35 m.a. [20]. Por el contrario, comparando las secuencias de los alelos de DPB1 en el humano, el chimpancé y el gorila, el análisis filogenético revela la presencia de grupos monofiléticos conteniendo secuencias derivadas exclusivamente de las especies individuales [21]. Esto significa que el polimorfismo en este locus fue generado recientemente, luego de la divergencia de los homínidos. Por el contrario, en los demás loci el polimorfismo precede este hecho y es heredado de forma transespecífica. Conclusiones similares han sido obtenidas en otros estudios que incluyen a los monos del Viejo Mundo en el análisis [22]. La baja persistencia de los alelos DPB1 está de acuerdo con el coeficiente de selección estimado por Satta et al. en el hombre para este locus. El mismo resultó ser muy bajo comparándolo con los demás loci del sistema HLA [23].

Mientras que las mutaciones puntuales son un mecanismo para generar nueva diversidad genética en el MHC, existe otro que parece ser de mayor importancia a la hora de dar origen al polimorfismo alélico. Es muy característico observar que los alelos de clase II comparten cortas secuencias (“motifs”), que corresponden a las regiones hipervariables, en el dominio beta 1 de la cadena beta. Como explicación para este hecho se propuso una especie de recombinación (llamada recombinación inter e intragénica o intercambio intrónico-exónico) que actúa barajando las secuencias de regiones hipervariables entre alelos. El mecanismo molecular para este tipo de eventos de recombinación no ha sido establecido en vertebrados superiores, pero parecería ser similar a la recombinación no recíproca (conversión génica) documentada en vertebrados inferiores, como levaduras y *Neurospora* [24]. Existen dos tipos de recombinación involucrados en la generación del polimorfismo: la intragénica, donde el intercambio ocurre entre alelos de un mismo locus; y la intergénica, donde son distintos loci los que participan en el proceso. Como la probabilidad de que ocurra un evento de recombinación depende del grado de semejanza de las secuencias donantes y receptoras, se espera que el primer tipo de recombinación mencionado ocurra con mayor frecuencia. Para determinar la validez de estos procesos en vertebrados superiores se determinó primero, que el hecho de compartir secuencias no se debía a la acumulación de mutaciones paralelas en diferentes linajes alélicos (convergencia) [24]. Si bien se ha demostrado que el mecanismo de recombinación intergénica puede haber jugado algún papel en la evolución de las moléculas de histocompatibilidad [25], la alta ocurrencia de este proceso llevaría a la homogeneización de los distintos isotipos presentes en el MHC y, por ende, a la pérdida de diversidad genética. Así, debe existir una fuerza selectiva que impida que este proceso ocurra de manera de permitir y mantener el polimorfismo. La recombinación intragénica, por el contrario, juega un papel preponderante en la generación del polimorfismo en el MHC, no sólo porque ocurre con mayor frecuencia sino también porque los productos generados por ella son probablemente ventajosos en términos selectivos.

2.4.3- MANTENIMIENTO DEL POLIMORFISMO

Para explicar el mantenimiento del polimorfismo los mecanismos selectivos son los aceptados actualmente. Pero la pregunta obvia que surge frente a esta afirmación es ¿cuál es

el agente causante de esa selección?. La función primaria del MHC es presentar péptidos a los linfocitos T lo que confiere protección contra los distintos patógenos. Además, la selección ocurre, justamente, en los sitios donde se ancla el péptido. El cambio en estos sitios puede modificar el péptido presentado, variando la respuesta inmune y por ende el valor adaptativo de un individuo frente un patógeno; entonces la selección debe ser ejercida por los patógenos. Otros agentes causantes del mantenimiento del polimorfismo MHC han sido propuestos, como ser, interacciones materno-fetales o preferencias en el apareamiento [26]. Los argumentos más convincentes hablan a favor de los patógenos como agentes de selección [27].

Volviendo a los mecanismos selectivos como forma de mantener las diferentes variantes alélicas en una población, existen dos de ellos aplicables al MHC, que son la **ventaja del heterocigota** y la **selección dependiente de la frecuencia**. En el primer modelo, un individuo heterocigota para los alelos HLA tendrá mayor capacidad que uno homocigota para presentar antígenos de distintos patógenos. Entonces los heterocigotas tendrán mayores ventajas selectivas. El segundo modelo puede considerarse una consecuencia de los mecanismos de escape de los patógenos al reconocimiento inmune dependiente del MHC [28]. De esta forma, las variantes del patógeno que logren escapar serán favorecidas. Sin embargo, cuando estas variantes se encuentren en un huésped con un genotipo MHC distinto, serán eliminadas eficientemente por el sistema inmune de este individuo en particular, ya que en él existirán distintas moléculas MHC que podrán presentarán diferentes péptidos, y todos los cambios en los péptidos originalmente seleccionados en el patógeno se volverán irrelevantes. En el contexto de la población de huéspedes, la mayoría de los eventos de escape ocurrirán en aquellos que tengan genotipo MHC más comunes por el simple hecho de que los patógenos pasan más tiempo en huéspedes que poseen genotipos más frecuentes. En este caso, la evolución del patógeno genera una desventaja para los alelos MHC más comunes y una ventaja para los más raros. Como los alelos más comunes se vuelven más raros y viceversa, el proceso se repite en forma cíclica y puede conducir al mantenimiento de un gran número de alelos.

En un gen, la probabilidad de que una mutación sea sinónima (es decir que el aminoácido codificado luego de la mutación no varíe) o no sinónima (la mutación hace que se codifique para un nuevo aminoácido) es la misma. Sin selección la relación sustituciones no sinónimas

(dn) a sustituciones sinónimas (ds) por sitio sinónimo y no sinónimo, respectivamente, debe ser igual a uno al comparar distintos alelos. La presencia de una selección positiva se evidenciará, entonces, con una relación dn/ds mayor que uno, ya que se están seleccionando cambios a nivel de la proteína; mientras que una relación menor que uno implicará que cualquier cambio en el aminoácido codificado está seleccionado en contra.

Al determinar el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas para los distintos loci de clase II se observa que para los sitios de reconocimiento antigénico (ARS) la relación dn/ds es mayor que uno en todos los casos analizados. Sobre estos codones, que se encuentran en contacto con el antígeno, está actuando una selección positiva, es decir, el cambio en estas regiones está favorecido. Por el contrario, en los codones no ARS la relación dn/ds observada es generalmente menor que uno lo que indica que los cambios que lleven a un aminoácido diferente se encuentran seleccionados negativamente. Por otro lado, el número de sustituciones sinónimas en los codones no ARS pueden ser tomados como una medida relativa de la “edad” del polimorfismo para cada locus. Así, la edad para los diferentes loci aumenta en el siguiente orden: DPB1, DRB3, DRB5, DRB1, DRB4, DQB1, DQA1 [29]. Lo sorprendente de este resultado surge al relacionarlo con el número de alelos presentes en cada locus, existiendo una relación inversa entre ambos parámetros. Es decir, los loci DP y DR son los más polimórficos y además, los más jóvenes. Esto podría explicarse por un aumento reciente en la intensidad de la selección que no afectó a DQB1 ni a DQA1. El patrón para los alelos de DQA, con un polimorfismo limitado mantenido desde hace períodos de tiempo evolutivo largos es compatible con el modelo de selección de ventaja del heterocigota, mientras que para DRB y DPB, con gran abundancia de alelos adquiridos recientemente, la selección dependiente de la frecuencia sería el modelo adecuado. Esto se debe al gran recambio de alelos que se da cuando actúa este tipo de selección equilibradora, lo que impide la alta persistencia de alelos.

HLA-DPB1 es un caso particular en varios sentidos. Mientras que los alelos de los otros loci de clase II se encuentran distribuidos con frecuencias consistentes con la selección equilibradora, es decir, muchos alelos presentes en frecuencias intermedias, en DP la distribución encontrada es en forma de J invertida (lo que ocurre con muchos otros loci nucleares), con un sólo alelo predominante encontrado en cada población, si bien este alelo varía de acuerdo con la grupo étnico analizado [21]. Otro dato que confirma la selección

equilibradora actuando sobre los alelos de DR y DQ surge del test de Ewens-Watterson donde las frecuencias observadas para cada locus (considerando la población mundial) se utilizan para calcular un estadístico de homocigosis que se compara con el valor esperado en condiciones de neutralidad. Si la selección purificadora está actuando el valor observado será mayor al esperado (debido a la presencia de alelos con bajas frecuencias), mientras que si la que está actuando es la selección equilibradora se espera lo contrario. De esta forma, para los loci DRB1 y DQB1, el estadístico encontrado fue menor que el predicho bajo neutralidad. Por el contrario, para DPB1 la distribución de alelos estuvo muy cerca de lo esperado en estas condiciones, lo que sugiere un mecanismo de mantenimiento del polimorfismo distinto para este locus (**fig. 9**) [27,30].

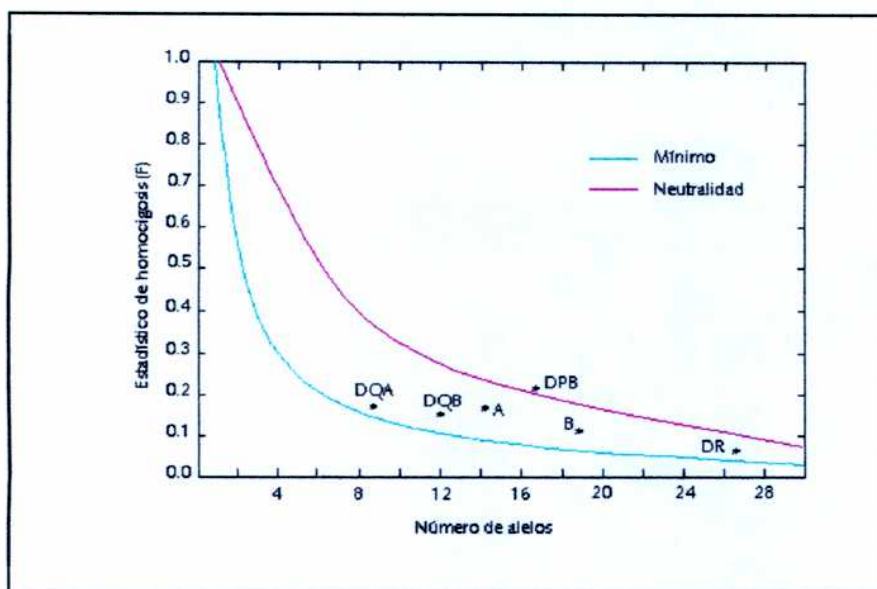


Figura 9: Gráfico del estadístico de homocigosis versus el número de alelos de los distintos loci del sistema HLA para los valores predichos en condiciones de neutralidad y como si los alelos estuvieran presentes en frecuencias iguales (mínimo=1/número de alelos). Se muestran las posiciones que ocupan los diversos loci [30].

En cuanto a la relación dn/ds en los sitios de reconocimiento antigénico también encontramos diferencias interesantes entre los distintos isotipos de clase II. Los valores obtenidos en humanos para DRB1, DQA1 y DQB1 son 2.1, 4.1 y 2.0 respectivamente [29], mientras que en DPB1 encontramos un valor de aproximadamente 200 sugiriendo una fuerte selección positiva en este último caso. Sorprendentemente, no se observó un exceso de cambios no sinónimos en sitios ARS en el chimpancé y el gorila, indicando una intensificación

de la selección para los alelos de DP en el linaje humano [21]. En los sitios que no intervienen en el reconocimiento antigénico encontramos valores de 0.5 para los primeros tres loci y de 2.0 para DP. Además, la tasa de sustitución (o tasa de evolución) sinónima para DPB1 es la mitad de la encontrada para los otros loci, lo que confirma el origen reciente de este locus.

De esta forma el locus HLA-DPB1 resulta interesante por tener una historia evolutiva propia, diferente a la de los demás loci de clase II. La existencia de selección actuando sobre este locus resulta un punto ambiguo. Existen posiciones encontradas respecto de este tema. La baja persistencia de alelos en el tiempo, el bajo coeficiente de selección estimado, el estadístico de homocigosis coincidente con el esperado en condiciones de neutralidad, el débil desequilibrio de ligamiento (ver más adelante), la distribución de alelos en forma de J invertida, son argumentos que hablan de ausencia de selección actuando sobre este locus. Sin embargo, la relación dn/ds obtenida para el hombre implica la existencia de una fuerte selección.

2.5- HLA Y GENÉTICA POBLACIONAL

2.5.1- DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Un aspecto interesante del HLA es el de poseer desequilibrio de ligamiento. El mismo es un fenómeno en el cual dos alelos de diferentes loci dentro del mismo cromosoma, se encuentran juntos en frecuencias que difieren con las esperadas por azar. Existen tanto asociaciones positivas como negativas; en las primeras los alelos se encuentran en frecuencias mayores a las esperadas y en las segundas, en frecuencias menores. Cuando este desequilibrio involucra a varios genes se habla de **haplotipos extendidos**. Numerosas combinaciones alélicas han sido documentadas en poblaciones Caucásicas, que incluyen loci de clase I, como HLA-A y HLA-B, y de clase II, HLA-DRB, DQA y DQB. Sin embargo, las asociaciones que involucran a DP (positivas o negativas) parecen ser débiles, mucho menos frecuentes y limitadas a determinadas poblaciones (si bien los resultados pueden variar) [31]. La **tabla 1** muestra algunos haplotipos donde se encontró desequilibrio de ligamiento que incluye a DP [30, 32, 33]. Por otro lado, para ciertas enfermedades, ciertamente se han encontrado

asociaciones fuertes entre HLA-DR/DQ y HLA-DP, como ser la enfermedad celíaca [34], la artritis reumatoidea juvenil [35-37] y la espondilitis anquilosante juvenil [38]. No obstante, esto puede deberse a que los individuos con una determinada patología poseen un *background* de genes que los predispone a la enfermedad.

Ciertas combinaciones favorecidas por la selección y otras que no lo son, puede ser una explicación para las asociaciones positivas y negativas, respectivamente, del desequilibrio de ligamiento, siendo este inversamente proporcional a la fracción de recombinación entre los genes involucrados. Existe una gran variación en la frecuencia de recombinación a lo largo del genoma (recordando que la probabilidad de que ocurra un evento de recombinación es proporcional a la distancia de separación entre los genes). Por otro lado, la recombinación parece suceder preferencialmente en ciertas regiones (hot spots) mientras que en otras ocurriría rara vez. Un buen ejemplo es la región DR/DQ donde se han encontrado muy pocos eventos de recombinación (alta asociación positiva, distancia aproximada = 100kb). Por el contrario, en la región comprendida entre DQ y DP se han reportado sitios de activa recombinación (distancia aproximada = 400kb), como ser una secuencia repetida $CA_{(n)}$ localizada en el tercer intrón del gen TAP1 y un hot spot encontrado en el segundo intrón del locus TAP2 [32, 39]. Esta podría ser una razón por la cual no se ha encontrado desequilibrio de ligamiento involucrando a DP. Tampoco hay que descartar las posibles ventajas selectivas que operen sobre ciertos haplotipos, manteniéndolos juntos.

<i>DRB1-DQA1-DQB1</i>	<i>DPB1</i>
0101-0101-0501	0402
1501-0102-0602	0401
1501-0102-0602	0501
0301-0501-0201	0101
0401-0301-0301	0401
0404-0301-0302	0601
1302-0102-0604	0301
07-0201-0201	1701
07-0201-0201	1101
1101-0501-0301	0401

Tabla 1: Haplotipos DPB1-DR/DQ con desequilibrio de ligamiento significativo encontrado en individuos Caucásicos.

2.5.2- FRECUENCIAS DE LOS ALELOS DPB1 EN DISTINTAS POBLACIONES.

Como se mencionó anteriormente, en las distintas poblaciones encontramos los alelos del locus DPB1 distribuidos en forma de J, con un alelo predominante que varía con el grupo étnico, y los demás alelos con frecuencias menores. Así, en las poblaciones de individuos Caucásicos estudiadas el alelo que se encuentra con mayor frecuencia es el DPB1*0401, seguido en algunos casos por el DPB1*0201 y en otros por el DPB1*0402. Por el contrario, en los individuos de raza negra (tanto americanos como africanos) el alelo predominante es el DPB1*0101 y en los amarillos el DPB1*0501, existiendo algunas excepciones en determinadas poblaciones [40-42].

Las poblaciones Amerindias resultan muy interesantes para ser estudiadas en su polimorfismo HLA por encontrarse relativamente aisladas de otros grupos étnicos. Por otro lado, se han reportado muchos alelos nuevos en estas poblaciones, tanto de clase I como de clase II, que derivarían de los fundadores por mutaciones puntuales o conversión génica [43]. Un aspecto destacable de estas poblaciones es la reducción a nivel del polimorfismo que se encuentra en los diferentes loci HLA. Esto no se debe al aislamiento de estas poblaciones ya que existen otras igualmente aisladas que no presentan esta restricción de alelos encontrada en los Amerindios [44]. Algunas de las posibles razones de la poca diversidad HLA encontrada en las tribus Indígenas de América podrían ser unos pocos alelos fundadores combinado con endogamia, pérdida de la población por enfermedad o condiciones climáticas adversas (cuello de botella) o la acción de la deriva génica en poblaciones pequeñas y aisladas.

Los estudios realizados en el locus HLA-DPB1 en algunas poblaciones Amerindias de Norteamérica, Colombia, Brazil y Argentina revelan la ya discutida restricción de alelos y la presencia, como alelo predominante, del DPB1*0402 en la mayoría de los casos, encontrándose luego, en frecuencias significativas, alelos que son raros en las poblaciones Caucásicas, como ser el DPB1*1301, el *1401 y el *3501, para citar algunos [45-47] .

2.6- HLA Y RESPUESTA ALOGÉNICA.

Para entender la naturaleza de ciertos métodos de tipificación es necesario primero comprender la *respuesta alogénica*. Así se denomina a la respuesta inmune contra las moléculas de histocompatibilidad extrañas y es ella la que media el rechazo de transplantes entre individuos histoincompatibles. Los linfocitos T, durante su ontogenia “aprenden” a diferenciar lo propio de lo ajeno. De esta forma, cuando se enfrentan a células que poseen en su superficie moléculas de histocompatibilidad no propias responden con una intensa proliferación y activación, con el subsecuente desarrollo de mecanismos efectores como la liberación de citoquinas si se trata de linfocitos T CD4, o la destrucción de las células extrañas si son los linfocitos T CD8 los involucrados. Además durante este proceso se generan anticuerpos contra las MHC extrañas (aloanticuerpos). Estos procesos llevan al desarrollo de un fenómeno inflamatorio que termina destruyendo el injerto (rechazo). La compatibilidad a nivel de clase II puede evidenciarse en el cultivo mixto linfocitario (CML). En esta reacción linfocitos irradiados del receptor (para evitar su proliferación) se enfrentan con linfocitos T CD4 del dador que proliferarán si el primero posee un haplotipo HLA de clase II diferente. Esta proliferación se determina por la incorporación de timidina tritiada.

2.7- TIPIFICACIÓN DEL SISTEMA HLA.

La tipificación del sistema HLA es la determinación de las variantes antigénicas o alélicas que porta un individuo. Existen para tal fin diversos métodos que se enumeran a continuación:

A- Serología: en este método se utilizan aloantisueros obtenidos de individuos politransfundidos o madres múltiparas o anticuerpos monoclonales cuya especificidad HLA se conoce y que reconocen una variante antigénica para un determinado locus. Estos antisueros se incuban con las células del individuo a tipificar en distintas fosas de una policubeta. Luego se agrega complemento y se evalúa la viabilidad celular en el microscopio. Cuando el antisuero haya reconocido la molécula de histocompatibilidad

correspondiente sobre la superficie de las células del individuo, el posterior agregado de complemento provocará la muerte de las mismas. De esta forma, el individuo será portador de aquellos antígenos que correspondan a la especificidad de los antisueros con los cuales haya reaccionado. Este método de tipificación es utilizado para las moléculas de clase I y para los loci de clase II HLA-DR y DQ. El locus DP no es estudiado por serología ya que existen escasos aloantisueros y anticuerpos monoclonales que reaccionen con determinantes polimórficos de este locus.

B- Cultivo mixto linfocitario (CML): como se mencionó anteriormente este método sirve para determinar la compatibilidad entre dos individuos a nivel de clase II pero también puede utilizarse para la tipificación de los antígenos del locus D cuando se utiliza una colección pre-caracterizada de células homocigotas para los antígenos conocidos de este locus. Estas células se irradian para evitar su proliferación y se las enfrenta con linfocitos del individuo a tipificar. Así, estos últimos responderán ante los alelos diferentes pero no ante los idénticos.

C- Test de los linfocitos primados (PLT): esta suerte de cultivo mixto linfocitario secundario fue el primer método que permitió determinar el polimorfismo a nivel del locus HLA-DP. Estas moléculas se expresan con baja densidad en la superficie celular y estimulan débilmente la proliferación de linfocitos T en el CML [48]. En este caso se debe disponer de linfocitos preestimulados in vitro (en un CML) con especificidad para el locus DP. Estas células se las enfrenta con células irradiadas del individuo a tipificar. Proliferarán los clones preestimulados que reconozcan las moléculas del locus DP idénticas a las utilizadas en su preestimulación. Mediante esta técnica pudieron definirse seis especificidades para DP, desde DPw1 a DPW6 [49].

En todos estos métodos se tipifica a las moléculas de histocompatibilidad en su forma nativa y sobre la superficie de la célula. Con el desarrollo de técnicas de biología molecular, en donde el análisis se efectúa a nivel del ADN, se pudo determinar que el polimorfismo para las MHC es mucho mayor al encontrado por serología o por CML.

Habitualmente, en los métodos de tipificación molecular se efectúa primero una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos del exón 2 para los alelos de clase II y los exones 2 y 3 para los de clase I. Como ya se mencionó, en estas zonas se encuentra la mayoría del polimorfismo que distingue los diferentes alelos. Luego de la amplificación los métodos difieren en la estrategia del reconocimiento de dicho polimorfismo para la asignación de los alelos.

D- PCR-polimorfismo en el largo de fragmentos de restricción (RFLP): el ADN amplificado se digiere con diversas enzimas de restricción (endonucleasas) y los fragmentos resultantes se corren en un gel de agarosa que puede ser revelado por tinción con bromuro de etidio. Cada alelo será digerido diferencialmente por las endonucleasas y podrá ser identificado por su característico patrón de bandas, evidenciadas en el gel [50].

E- PCR-sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia (SSO): una vez amplificado, el producto de PCR se siembra en membranas de nylon o nitrocelulosa y se hibrida con un conjunto de sondas (conjugadas con enzimas o marcadas radioactivamente) específicas de secuencia. Las sondas son fragmentos de ADN cortos complementarios a regiones polimórficas dentro de la secuencia amplificada. El patrón de positivos y negativos obtenido con todo el conjunto de sondas (luego del revelado correspondiente), permite identificar cada alelo [51].

Si bien estos métodos permiten determinar los diferentes alelos de un locus, pueden resultar complicados cuando el polimorfismo es grande, ya que para un análisis exacto que permita la definición de todos los alelos se necesitan muchas sondas o enzimas de restricción. Ambos métodos pueden detectar alelos “nuevos” que se evidenciarán cuando el patrón resultante sea desconocido. Sin embargo, ya que las sondas (al igual que las enzimas) reconocen sitios de polimorfismo definidos, ambos PCR-RFLP y PCR-SSO no podrán definir nuevos alelos si la sustitución nucleotídica no se encuentra en alguno de los sitios de restricción o en alguna de las regiones cubiertas por las sondas.

F- PCR con primers específicos de secuencia (SSP): en este caso, la muestra a tipificar se amplifica por PCR con distintos pares de primers, donde cada par amplifica selectivamente uno o, a lo sumo, un grupo de alelos. Así, la determinación del fenotipo

HLA se simplifica a correr en un gel los distintos productos y observar la presencia o ausencia de amplificación [52].

G- **PCR-polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP)**: el ADN amplificado se desnaturaliza a 96°C y luego se coloca en hielo. Se corre en un gel de poliacrilamida y se revela mediante una tinción con plata. Este método consiste en la separación de las cadenas de ADN; estos ADN simple cadena, según su secuencia, adoptarán en el espacio diferentes conformaciones. Cada alelo o combinación de ellos poseerá un patrón de bandas característico con el que puede ser identificado [53, 54].

H- **PCR-secuenciación**: en un primer paso el producto amplificado debe ser purificado ya que los primers y los nucleótidos usados en la PCR pueden interferir en la reacción de secuenciación. Se utilizan equipos de secuenciación automática que pueden realizar la siembra de la muestra, la lectura del gel y su posterior análisis. Para esto último el equipo posee un software de análisis de secuencia que produce trazos de colores (uno por cada nucleótido) llamado electroferograma. Así se pueden visualizar los puntos en donde los picos se superponen y que corresponden a secuencias heterocigotas. El análisis computarizado de todas las combinaciones posibles de heterocigotas da como resultado la tipificación del locus estudiado. Esta técnica es la más eficaz para identificar alelos nuevos [55].

En los métodos PCR-SSO, PCR-RFLP y PCR-secuenciación, en general se amplifican los dos alelos del locus a tipificar. Así, el patrón de tipificación de un individuo sería igual a la “suma” de los patrones de cada alelo. Por esta razón un inconveniente de estas técnicas es la existencia de ambigüedades. Una ambigüedad se define como el patrón de tipificación que corresponde a más de una combinación de alelos. Esto ocurre debido a que estos pares de alelos comparten motifs en las regiones polimórficas, pero en distintas combinaciones. Así, no se puede determinar si estos motifs están presentes en cis o en trans. En consecuencia, por el resultado de la tipificación no se puede discriminar cuál de las dos combinaciones posibles de alelos es la verdadera. La **tabla 2** muestra un ejemplo de una ambigüedad para PCR-SSO. Los números (del 1 al 5) representan sondas específicas de secuencia. Como se puede ver, si bien cada alelo por separado posee un patrón que permite identificarlo, las combinaciones

heterocigotas no pueden ser discriminadas con este juego de sondas ya que la suma de los patrones individuales de los alelos que constituyen la ambigüedad es igual.

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
0401	+	-	+	-	+
0301	+	+	-	-	+
0402	+	+	+	-	+
0801	+	-	-	-	+
0401/0301	+	+	+	-	+
0402/0801	+	+	+	-	+

+: positivo -: negativo

Tabla 2: Ambigüedad en la tipificación por PCR-SSO. Las sondas están representadas del 1 al 5 y se muestra el patrón de pegado de las mismas para los alelos por separado y constituyendo la ambigüedad (en azul).

Este tipo de inconveniente puede solucionarse utilizando métodos como el de PCR-SSP diseñando los primers adecuados, o el de PCR-SSCP donde la movilidad de las cadenas simples será distinta para los alelos que constituyen la ambigüedad.

3. OBJETIVOS

Debido a que la complejidad alélica de HLA-DP en las diversas poblaciones que habitan la República Argentina es absolutamente desconocida, el primer objetivo de este trabajo es estudiar este polimorfismo en cuatro poblaciones argentinas normales diferentes: individuos caucásicos que habitan Capital y suburbios (con ancestros criollos, españoles o italianos), un grupo de indígenas Mapuches de una comunidad aislada de la Prov. de Neuquén (Blancura Centro), un grupo de Indígenas Chiriguano y otro de Mataco-Wichis de Orán. Salta.

El segundo objetivo es elucidar aspectos sobre los mecanismos selectivos que actúan sobre este locus, ya que el mantenimiento del polimorfismo en el mismo parece involucrar mecanismos distintos de los que intervienen en los demás loci HLA.

Como último objetivo se desea, mediante el estudio de frecuencias de los genes HLA de clase II, investigar las relaciones genéticas entre varios grupos étnicos, para lo que se calcularán las distancias genéticas entre poblaciones y se construirán árboles filogenéticos con el fin de conocer antiguas migraciones y relaciones de parentesco entre los habitantes de América principalmente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1- PANEL DE INDIVIDUOS A TIPIFICAR

204 individuos Caucásicos argentinos normales con ancestros argentinos, españoles o italianos fueron seleccionados para conformar el panel normal. También se dispone de muestras de ADN de 47 indígenas Mapuches de una comunidad cercana a la localidad de Blancura Centro, en la provincia de Río Negro. Asimismo se dispone de ADN de 18 muestras de Indígenas Mataco-Wichis que habitan en las cercanías de Orán, Salta y de 49 indígenas Chiriguano de la misma región. Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas usando EDTA al 5% como anticoagulante.

Los Mapuches (araucanos) representan el último elemento indígena establecido en el país, procedían de Chile y su entrada se va haciendo pronunciada a mediados del siglo XVII. Actualmente son cerca de 30 a 35000 individuos en comunidades y 20 a 30000 dispersos en estancias, pueblos y ciudades. Ocupando tierras fiscales se dedican a la cría de ovejas y chivas, al cultivo de trigo, avena y cebada. Las mujeres continúan la tradición ancestral del tejido. se los encuentra en las provincias de Río Negro, Chubut y Neuquén [56, 57].

Los Chiriguano pertenecen a la familia lingüística tupí-guaraní que se extendieron por Paraguay, Bolivia y ya habían penetrado en el actual territorio argentino a la llegada de los españoles (siglo XVI). En la actualidad se encuentran en las provincias de Salta y Jujuy con una sólida organización socioeconómica y una fuerte identidad cultural. Su número es superior a los 20000 y conservan pautas culturales tradicionales como el rol de los ancianos, las fiestas ancestrales y el cacicazgo. Ocupan tierras fiscales y de órdenes religiosas; siembran maíz, porotos, zapallo, caña de azúcar, frutales y mandioca. Mantienen sus pautas de cazadores, pescadores y artesanos de cerámica y máscaras [57].

Los Matacos-Wichis pertenecen a la familia lingüística integrada por los grupos matacos, mataguayos, chorotes y chulupíes. Actualmente ocupan las provincias de Salta, Formosa, Chaco y el sur de Paraguay y su número se calcula en 25000. Se estima que su ingreso en la región ocurrió a mediados del siglo XVI y que su procedencia ha de haber sido el norte o el este [57]. Continúan con sus ancestrales tareas de caza, pesca y recolección así como también desarrollan algunas actividades agrícolas en relación de dependencia y artesanales.

Mantienen vigentes los sistemas de jefatura o cacicazgo y el Consejo de Ancianos en todas sus comunidades [56].

4.2- TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ALELOS HLA-DPB1

Para la tipificación molecular de los alelos HLA-DPB1 primero se extrae el ADN a partir de sangre periférica, para luego amplificar del exón 2 del locus DPB1 por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de PCR se hibrida con sondas específicas de secuencia (SSO) marcadas radioactivamente que pegan en las regiones polimórficas del exón previamente amplificado.

4.2.1- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Partiendo de 350 µl de sangre periférica con EDTA se lisaron los glóbulos rojos con el agregado de 1 ml de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) y se obtuvo un pellet de glóbulos blancos por centrifugación (1 min. a 10000 r.p.m.) descartando el sobrenadante. El proceso se repite tres veces. El pellet así obtenido se resuspendió en 250 µl de buffer K (50 mM ClK; 10 mM tris (pH=7,4); 2,5 mM ClMg₂; 0,5% del detergente NP40; 100 µg/ml de proteinasa K) y se incubó por 60 min. a 64° C para romper los glóbulos blancos. Luego se agregaron 240 µl de ClNa 2,5 M y se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 10 min. a modo de precipitar las proteínas. Se recupera el sobrenadante por volcado en un eppendorf limpio al que luego se le agregó 1 ml de etanol absoluto (99,5%) con el propósito de precipitar el ADN, el cual se visualiza en forma de ovillo. Luego de 2 min. de una centrifugación a 10000 r.p.m. se descartó el etanol y se resuspendió el ADN en 300 µl de agua.

4.2.2- AMPLIFICACIÓN POR PCR

Para la tipificación de los alelos del locus DPB1 se utilizaron dos estrategias de amplificación: una *amplificación genérica* donde los primers usados son el 2DPBAMP-A y el 2DPBAMP-B y una *amplificación específica* que permite dividir a los alelos de este locus en dos grupos, ya que utiliza para ello el polimorfismo en los codones 85-87. La combinación 2DPBAMP-C y 2DPBAMP-E permite la amplificación de un conjunto de

alelos, llamados del **grupo A**, que poseen la secuencia GMP en los residuos 85, 86 y 87. Los alelos restantes constituyen el denominado **grupo B** y poseen la secuencia EAV en los residuos 85-87. Los alelos de este grupo pueden ser amplificados específicamente con los primers 2DPBAMP-C y 2DPBAMP-F [9]. Los alelos incluidos en los grupos A y B están listados en la **tabla 3**. La **tabla 4** muestra los primers antes mencionados para la amplificación del exón 2 de DPB1, tanto genérica como específica.

ALELOS PERTENECIENTES AL GRUPO <i>A</i> <i>N= 24</i>		ALELOS PERTENECIENTES AL GRUPO <i>B</i> <i>N= 36</i>		
0201	3901	0101	1901	3701
0202	4001	0301	2001	3801
0401	4101	0501	2101	4401
0402	4601	0601	2201	4501
1501	4701	0801	2501	5001
1801	4801	0901	2601	5201
2301	4901	1001	2701	5401
2401	5101	1101	2901	5501
2801	5301	1301	3001	5601
3201	5901	1401	3101	5701
3301	6001	1601	3501	5801
3401	6201	1701	3601	6101

Tabla 3: Alelos pertenecientes a los grupos A y B definidos por su amplificación diferencial con los primers 2DPB-AMP-E y 2DPB AMP-F respectivamente.

PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE DPB1

NOMBRE	CODONES	SECUENCIA DE ADN	ORIENTACIÓN
• DPB GENÉRICO	EXON 2		
2DPBAMP-A	INTRON	GAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT	5' cod
2DPBAMP-B	INTRON	GCCGGCCCAAAGCCCTCACT	compl.
• DPB ESPECÍFICO	EXON 2		
2DPBAMP-C	-5 +7	CCC CTC CCC GCA GAG AAT TAC	5' cod
2DPBAMP-E	85 - 91	GCG CTG CAG GGT CAT GGG CC	compl. *
2DPBAMP-F	85 - 91	GCG CTG CAG GGT CAC GGC CT	compl. \$

Tabla 4: Primers genéricos y específicos utilizados para la amplificación del locus DPB1. Se indica el nombre, la posición donde pegan (codones), la secuencia (hebra codificante, 5' a 3') y la orientación; comp.: secuencia complementaria a la secuencia codificante.

(*) **Primer E grupo específico (PGE-E):** pega secuencias de alelos con los residuos GPM 85-87. Las muestras positivas con las sondas 2DPB-8501 y 2DPB-8502 se deben amplificar con los primers 2DPBAMP-C / 2DPBAMP-E.

(\$) **Primer F grupo específico (PGE-F) :** pega secuencias de alelos con los residuos EAV 85-87. Las muestras positivas con la sonda 2DPB-8503 se deben amplificar con los primers 2DPBAMP-C / 2DPBAMP-F.

La amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 50 µl que contenía: 0.5 a 1.0 µg de ADN, 1 U de Taq DNA polimerasa I, 5 µl de Buffer 10 x PCR (100 mM Tris, 500 mM KCl, 1 % de Triton X-100), 1.5 a 2.5 mM de ClMg_2 (dependiendo de las condiciones de cada par de primers), 10 x dNTPs (0.25 mM de cada uno), 25 pmoles de cada uno de los primers, agua destilada hasta completar 50 µl. La reacción se cubrió con 50 µl de aceite mineral para evitar la evaporación y se llevó a cabo en un termociclador MJ Researcher. A partir de las condiciones recomendadas en el protocolo del XI Workshop Internacional de Histocompatibilidad se probaron diferentes temperaturas de “annealing” y distintas concentraciones de ClMg_2 para cada par de primers hasta encontrar el óptimo (puesta a punto). Los resultados de la reacción se analizaron por electroforesis de una alícuota de 2 µl en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, usando como buffer de corrida Tris-borato-EDTA (TBE). Luego de correr las muestras durante 10 minutos a 60 Volts el producto de PCR fue visualizado en un transiluminador de U.V.

AMPLIFICACION	NÚMERO DE CICLOS	TEMP INICIAL (°C)	TIEMPO (seg.)	TEMP ANNEALING (°C)	TIEMPO (seg.)	TEMP FINAL (°C)	TIEMPO (seg.)	[ClMg_2] (mM)
Función		desnaturalización		pegado específico de primers		extensión		
GENÉRICA	30	94	30	58	60	72	60	2.0
GRUPO A	primeros 15 ciclos	94	60	70	60	72	60	2.0
	segundos 15 ciclos	94	60	68	60	72	60	
GRUPO B	primeros 15 ciclos	94	60	70	60	72	60	2.0
	segundos 15 ciclos	94	60	67	60	72	60	

Tabla 5: Programas de PCR empleados para la amplificación genérica y específica (del grupo A y B). Todos los programas incluyen un paso inicial de desnaturalización de 3 minutos a 94° C y un último paso de extensión de 7 minutos a 72° C. Los programas difieren en las temperaturas de annealing y para los grupos específicos se utilizan dos temperaturas de annealing diferentes (ciclos concatenados). También se indica la concentración óptima de ClMg_2 .

Las condiciones óptimas de amplificación se muestran en la **tabla 5**. En todos los casos, antes de la iniciación de los 30 ciclos se precalientan las muestras a 94°C por 3 minutos y al finalizar los ciclos se dejan 7 minutos a 72°C con el fin de que la extensión se complete en todas las copias. En las amplificaciones específicas se debieron hacer ciclos concatenados con dos temperaturas de annealing diferentes. Controles positivos y negativos fueron

incluidos en cada amplificación grupo específica. Estos controles son muestras de ADN previamente tipificadas. El positivo pertenecerá al grupo a amplificar y el negativo estará incluido en el otro grupo.

4.2.3- HIBRIDACIÓN CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS

4.2.3.1- Preparación y siembra de las membranas.

Diez membranas de nylon fueron cortadas con un tamaño que depende del número de muestras a tipificar para ser hibridadas tres veces. Las mismas se sumergieron en agua destilada por 10 minutos y luego en SSPE 10x (SSPE 20x = 3 M NaCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA pH = 7.4) por el mismo tiempo y se secan en estufa a 60° C. Cincuenta nanogramos (2 µl.) del producto de PCR amplificado de cada muestra se sembró en las membranas con una pipeta multicanal Robbins Scientific (seis muestras por fila). Una vez sembradas todas las muestras, las membranas se colocaron por 5 minutos en NaOH 0.4 N con el fin de desnaturalizar las hebras de ADN, luego se las colocaron por 10 minutos con SSPE 10 x y por último se fijó el ADN con luz UV por 2 minutos.

4.2.3.2- Marcación de las sondas.

La marcación de cada sonda se realizó incubando 30 minutos a 37° C la siguiente mezcla de reacción (volumen final de 25 µl.): 5 pmoles del oligonucleótido (SSO), 2.5 µl de Buffer Kinasa 10x (0.5 Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M de MgCl₂, 50 mM de DTT, 1 mM de espermidina HCl), 30 µCi de [γ -³²P]ATP, 10 unidades de T4 polinucleótido kinasa (0.5 µl.), y agua destilada hasta completar los 25 µl.

4.2.3.3- Hibridación de las membranas.

Las membranas se prehibridaron en una primera etapa para impedir el eventual pegado inespecífico de marca en los sitios donde no se ha sembrado ADN. Las membranas se colocaron en una incubadora por aire de Robbins Scientific por lo menos 1 hora a 42° C con 3

ml. de una solución que contiene la siguiente composición: 6x SSPE, 0.1% SDS, 5x Denhardt (Denhardt 100x = 2% PVP, 2% Ficoll, 0.02 gr/ml BSA), 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón (SSS). En la misma incubadora se le agregó el oligonucleótido marcado (5 pmoles) y se incubó a la misma temperatura de 1 a 16 horas. Una vez transcurrido este tiempo se descartó la solución de hibridación y se lavaron las membranas dos veces con 100 ml. de 2x SSPE, 0.1% SDS a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se procedió al lavado con una solución de cloruro de tetrametilamonio (solución de TMAC = 50 mM Tris-HCl pH = 8.0, 3.0 M TMAC, 2 mM EDTA, 0.1% SDS) a la temperatura de disociación del oligonucleótido que debió ser puesta a punto para cada uno. Para ello se sembraron en las membranas un control positivo y uno negativo de hibridación.

Los resultados se obtuvieron por autorradiografía con película Kodak luego de 3 a 16 horas de exposición. Para la rehibridación con otras sondas, las membranas se lavaron con NaOH 0.4 N a 42° C durante 30 minutos, y luego se colocaron a la misma temperatura con 0.2 M Tris, 0.14 x SSPE, 0.14 x SDS durante otros 30 minutos. Luego de este proceso se debe empezar nuevamente con la prehibridación.

La hibridación de los productos de PCR obtenidos con la amplificación genérica y específica puede realizarse simultáneamente con el mismo set de sondas. Alternativamente, la amplificación grupo específica puede aplicarse a las muestras heterocigotas para los residuos 85-87.

La **tabla 6** muestra el nombre, secuencia y temperatura de lavado con TMAC de los oligonucleótidos así como también se enumeran las especificidades de cada SSO.

En la **figura 10** se muestra la secuencia del exón 2 para todos los alelos del locus HLA-DPB1 y se ubica el sitio de pegado de cada sonda y de los primers específicos 2DPBAMP-E y F.

SONDAS PARA LA TIPIFICACIÓN DE DPB1

A- SONDAS Y SECUENCIAS DE DPB1

NOMBRE	TEMPERATURA DE LAVADO (° C)	SECUENCIA
0901	55.0	G AAT TAC CTT TTC CAG GGA
0902	61.5	TAC GTG TAC CAG TTA CGG
0903	58.5	GTG TAC CAG GGA CGG CAG
0904	58.5	TAC GTG CAC CAG TTA CGG
1701	58.5	GAA TGC TAC CCG TTT AAT
3501	61.5	GG GAG GAG TTC GCG CGC T
3502	60.5	GG GAG GAG TTC GTG CGC T
3503	58.5	GG GAG GAG CTC GTG CGC T
3504	59.5	AC AAC CGG CAG GAG TAC G
3505	61.5	GG GAG GAG TAC GCG CGC T
5501	58.5	GG CCT GCT GCG GAG TAC T
5502	60.5	GG CCT GAT GAG GAG TAC T
5503	58.5	GG CCT GAG GCG GAG TAC T
5504	55.0	GG CCT GAT GAG GAC TAC T
5505	58.5	GG CCT GAT GAG GTG TAC T
6502	58.0	GC CAG AAG GAC CTC CTG G
6503	58.5	GC CAG AAG GAC TTC CTG G
6504	58.5	GCC AGA AGG ACA ACC TGG
6901	59.5	GAC ATC CTG GAG GAG AAG C
6902	58.5	G CTC CTC CTC CAG GAT GTC *
6903	58.5	GAC CTC CTG GAG GAG AAG CG
6905	55.0	AC CTC CTG GAG GAG AGG C
6906	58.5	GAG GAG AAG CGG GCA GTG
6907	55.0	AAG CGG GCA TTG CCG GAC A
7601	58.5	G GAC AGG ATG TGC AGA CA
7602	58.5	G GAC AGG GTA TGC AGA CA
7603	59.5	G GAC AGG ATA TGC AGA CA
7604	55.0	CCG GAC AGA GTA TGC AGA
8501	53.0	AG CTG GGC GGG CCC ATG A
8502	58.5	AG CTG GTC GGG CCC ATG A
8503	58.5	AG CTG GAC GAG GCC GTG A

Complementaria a la secuencia
codificante

B- ESPECIFICIDAD DE LAS SONDAS DE DPBI

AMPLIFICACIÓN GENÉRICA

PRIMERS : 2DPBAMP-A ; 2DPBAMP-B

SSO	ESPECIFICIDAD ALÉLICA
• DPB 0901	DPB1* 0201+0202+0401+0402+0501+0801+1601+1901+2201+2301+2401+2801+3101+3201+3301+3401+3801+3901+4001+4101+4601+4701+4801+4901+5101+5301+5701+5901+6001+6201
• DPB 0902	DPB1* 0301+0601+1101+1301+2001+2101+2501+2601+2701+2901+3601+3701+4401+5201+5601+6101
• DPB 0903	DPB1* 0101+1501+1801+5001
• DPB 0904	DPB1* 0901+1001+1401+1701+3001+3501+4501+5401+5501+5801
• DPB 1701	DPB1* 3801
• DPB 3501	DPB1* 0401+2401+2801+3101+3301+5101+5601
• DPB 3502	DPB1* 0201+0301+0402+0601+0801+0901+1001+1401+1601+1701+1801+1901+2001+2301+2501+2901+3001+3201+3501+3701+4101+4501+4601+4701+5001+5201+5401+5501+5701+5901+6001+6101
• DPB 3503	DPB1* 0202+0501+2101+2201+3401+3601+3801+4401+4801+5801+6201
• DPB 3504	DPB1* 1101+1501
• DPB 3505	DPB1* 0101+1301+2601+2701+3901+4001+4901+5301
• DPB 5501	DPB1* 0101+0401+1101+1301+1501+2301+2601+2701+3101+3301+3401+3901+4001+5201+5501+5601+5801+6201
• DPB 5502	DPB1* 0201+0402+0801+1001+1601+1801+2501+2801+3701+4101+4501+4801+4901+5101+5301+5901+6001
• DPB 5503	DPB1* 0202+0501+1901+2101+2201+2401+3001+3601+3801+4701+5401
• DPB 5504	DPB1* 0301+0601+0901+1401+1701+2001+2901+3501+4401+4601+5001+5701+6101
• DPB 5505	DPB1* 3201
• DPB 6502	DPB1* 0301+0601+1101+1401+1501+2001+2501+2801+2901+3101+3401+4401+4501+5001+5201+5601+5701+5901
• DPB 6503	DPB1* 4101
• DPB 6901	DPB1* 0101+0401+0402+0501+1801+2301+2401+2601+2701+3501+3601+3801+3901+4001+4901+5101+5301+6201
• DPB 6902	DPB1* 0201+0202+0801+0901+1001+1301+1601+1701+1901+2101+2201+3001+3201+3301+3701+4601+4701+4801+5401+5501+5801
• DPB 6903	DPB1* 0301+1401+2001+2501+2801+3101+3401+4501+5001+5201+5601+5701+

		5901
• DPB 6905	DPB1*	1101+1501
• DPB 6906	DPB1*	0101+0301+0401+0402+0501+1401+1801+2001+2301+2401+2501+2601+ 2701+2801+3501+3601+3801+3901+4001+4501+4901+5001+5101+5201+ 5301+5601+5701+5901+6001+6201
• DPB 6907	DPB1*	3101+3401
• DPB 7601	DPB1*	0201+0202+0401+0402+0501+0601+1101+1501+1601+1701+1801+2001+ 2101+2201+2301+2401+2701+2801+3001+3101+3201+3301+3401+3601+ 3801+3901+4001+4101+4601+4701+4801+4901+5101+5301+5501+5801+ 5901+6001+6201
• DPB 7602	DPB1*	0101+0301+0801+0901+1001+1401+2501+2601+2901+3501+3701+4401+ 4501+5001+5201+5401+5601+5701+6101
• DPB 7603	DPB1*	1301+1901
• DPB 7604	DPB1*	2601
• DPB 8501	DPB1*	0201+0202+0401+0402+2301+2401+3201+3301+3901+4101+4601+4701+ 4801+4901+5101+5901+6001
• DPB 8502	DPB1*	1501+1801+2801+3401+4001+5301+6201
• DPB 8503	DPB1*	0101+0301+0501+0601+0801+0901+1001+1101+1301+1401+1601+1701+ 1901+2001+2101+2201+2501+2601+2701+2901+3001+3101+3501+3601+ 3701+3801+4401+4501+5001+5201+5401+5501+5601+5701+5801+6101

ESPECIFICIDAD DE LAS SONDAS PARA DPB1 USANDO EL PRIMER ESPECÍFICO E
--

AMPLIFICACIÓN DEL GRUPO A

PRIMERS : 2DPBAMP-C; 2DPBAMP-E

SSO	ESPECIFICIDAD ALÉLICA
• DPB 0901	DPB1* 0201+0202+0401+0402+2301+2401+2801+3201+3301+3401+3901+4001+ 4101+ 4601+4701+4801+4901+5101+5301+5901+6001+6201
• DPB 0902	DPB1* NINGUNO
• DPB 0903	DPB1* 1501+1801
• DPB 0904	DPB1* NINGUNO
• DPB 1701	DPB1* NINGUNO
• DPB 3501	DPB1* 0401+2401+2801+3301+5101
• DPB 3502	DPB1* 0201+0402+1801+2301+3201+4101+4601+4701+5901+6001
• DPB 3503	DPB1* 0202+3401+4801+6201
• DPB 3504	DPB1* 1501

• DPB 3505	DPB1*	3901+4001+4901+5301
• DPB 5501	DPB1*	0401+1501+2301+3301+3401+3901+4001+6201
• DPB 5502	DPB1*	0201+0402+1801+2801+4101+4801+4901+5101+5301+5901+6001
• DPB 5503	DPB1*	0202+2401+4701
• DPB 5504	DPB1*	4601
• DPB 5505	DPB1*	3201
• DPB 6502	DPB1*	1501+2801+3401+5901
• DPB 6503	DPB1*	4101
• DPB 6504	DPB1*	6001
• DPB 6901	DPB1*	0401+0402+1801+2301+2401+3901+4001+4901+5101+5301+6201
• DPB 6902	DPB1*	0201+0202+3201+3301+4601+4701+4801
• DPB 6903	DPB1*	2801+3401+5901
• DPB 6905	DPB1*	1501
• DPB 6906	DPB1*	0401+0402+1801+2301+2401+2801+3901+4001+4901+5101+5301+5901+6001+6201
• DPB 6907	DPB1*	3401
• DPB 7601	DPB1*	0201+0202+0401+0402+1501+1801+2301+2401+2801+3201+3301+3401+3901+4001+4101+4601+4701+4801+4901+5101+5301+5901+6001+6201
• DPB 7602	DPB1*	NINGUNO
• DPB 7603	DPB1*	NINGUNO
• DPB 7604	DPB1*	NINGUNO
• DPB 8501	DPB1*	0201+0202+0401+0402+2301+2401+3201+3301+3901+4101+4601+4701+4801+4901+5101+5901+6001
• DPB 8502	DPB1*	1501+1801+2801+3401+4001+5301+6201
• DPB 8503	DPB1*	• NO TESTEADO

ESPECIFICIDAD DE LAS SONDAS PARA DPB1 USANDO EL PRIMER ESPECÍFICO F

AMPLIFICACIÓN DEL GRUPO B

PRIMERS : 2DPBAMP-C; 2DPBAMP-F

SSO	ESPECIFICIDAD ALÉLICA
• DPB 0901	DPB1* 0501+0801+1601+1901+2201+3101+3801+5701
• DPB 0902	DPB1* 0301+0601+1101+1301+2001+2101+2501+2601+2701+2901+3601+3701+4401+5201+5601+6101
• DPB 0903	DPB1* 0101+5001
• DPB 0904	DPB1* 0901+1001+1401+1701+3001+3501+4501+5401+5501+5801

• DPB 1701	DPB1*	3801
• DPB 3501	DPB1*	3101+5601
• DPB 3502	DPB1*	0301+0601+0801+0901+1001+1401+1601+1701+1901+2001+2501+2901+ 3001+3501+3701+4501+5001+5201+5401+5501+5701+6101
• DPB 3503	DPB1*	0501+2101+2201+3601+3801+4401+5801
• DPB 3504	DPB1*	1101
• DPB 3505	DPB1*	0101+1301+2601+2701
• DPB 5501	DPB1*	0101+1101+1301+2601+2701+3101+5201+5501+5601+5801
• DPB 5502	DPB1*	0801+1001+1601+2501+3701+4501
• DPB 5503	DPB1*	0501+1901+2101+2201+3001+3601+3801+5401
• DPB 5504	DPB1*	0301+0601+0901+1401+1701+2001+2901+3501+4401+5001+5701+6101
• DPB 5505	DPB1*	NINGUNO
• DPB 6502	DPB1*	0301+0601+1101+1401+2001+2501+2901+3101+4401+4501+5001+5201+ 5601+5701
• DPB 6503	DPB1*	NINGUNO
• DPB 6901	DPB1*	0101+0501+2601+2701+3501+3601+3801
• DPB 6902	DPB1*	0801+0901+1001+1301+1601+1701+1901+2101+2201+3001+3701+5401+ 5501+5801
• DPB 6903	DPB1*	0301+1401+2001+2501+3101+4501+5001+5201+5601+5701
• DPB 6905	DPB1*	1101
• DPB 6906	DPB1*	0101+0301+0501+1401+2001+2501+2601+2701+3501+3601+3801+4501+ 5001+5201+5601+5701
• DPB 6907	DPB1*	3101
• DPB 7601	DPB1*	0501+0601+1101+1601+1701+2001+2101+2201+2701+3001+3101+3601+ 3801+5501+5801
• DPB 7602	DPB1*	0101+0301+0801+0901+1001+1401+2501+2601+2901+3501+3701+4401+ 4501+5001+5201+5401+5601+5701+6101
• DPB 7603	DPB1*	1301+1901
• DPB 7604	DPB1*	2601
• DPB 8501	DPB1*	• NO TESTEADO
• DPB 8502	DPB1*	• NO TESTEADO
• DPB 8503	DPB1*	0101+0301+0501+0601+0801+0901+1001+1101+1301+1401+1601+1701+ 1901+2001+2101+2201+2501+2601+2701+2901+3001+3101+3501+3601+ 3701+3801+4401+4501+5001+5201+5401+5501+5601+5701+5801+6101

Tabla 6: A- Nombres, secuencias y temperaturas de lavado con TMAC de cada oligonucleótido específico de secuencia (SSO). B- Especificidad de los SSO tanto para la amplificación genérica como para las del grupo A y grupo B.

DPB1*01011	G	GCC	ACT	CCA	GAG	AAT	TAC	GTG	TAC	CAG	GGA	CGA	CGC	CGC	CGG	GAG	TAC	GAG	CGC
DPB1*01012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPB1*02011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPB1*02012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPB1*0202	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*0301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPB1*0401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPB1*0402	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPB1*0501	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*0601	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*0801	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*0901	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*1001	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*11011	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*11012	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*1301	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*1401	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*1501	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*1601	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*1701	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*1801	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*1901	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*20011	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*20012	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*2101	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*2201	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*2301	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*2401	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*2501	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*26011	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*26012	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*2701	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*2801	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*2901	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3001	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3101	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3201	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3301	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3401	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3501	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3601	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3701	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3801	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*3901	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*4001	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*4101	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*4401	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*4501	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*4601	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*4701	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*4801	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
DPB1*4901	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Figura 10: Secuencias de los alelos del locus HLA-DPB1 (exón 2, del codón número 1 al 100) y de los sitios de pegado de cada sonda (SSOP) así como de los primers AMP-F y AMP-E. Se muestra la secuencia del alelo DPB1*0101. Los asteriscos indican sitios no secuenciados mientras que los guiones corresponden a nucleótidos iguales a la secuencia del DPB1*0101.

	40	50	60	70
DPB1*01011	TTC GAC AGC	GTG GGG GAG	TTC CGG GTG	ACG GCG CTG
DPB1*01012	---	---	---	---
DPB1*02011	---	---	---	---
DPB1*02012	---	---	---	---
DPB1*0301	---	---	---	---
DPB1*0401	---	---	---	---
DPB1*0402	---	---	---	---
DPB1*0501	---	---	---	---
DPB1*0601	---	---	---	---
DPB1*0801	---	---	---	---
DPB1*0901	---	---	---	---
DPB1*1001	---	---	---	---
DPB1*11011	---	---	---	---
DPB1*11012	---	---	---	---
DPB1*1301	---	---	---	---
DPB1*1401	---	---	---	---
DPB1*1501	---	---	---	---
DPB1*1601	---	---	---	---
DPB1*1701	---	---	---	---
DPB1*1801	---	---	---	---
DPB1*1901	---	---	---	---
DPB1*20011	---	---	---	---
DPB1*20012	---	---	---	---
DPB1*2101	---	---	---	---
DPB1*2201	---	---	---	---
DPB1*2301	---	---	---	---
DPB1*2401	---	---	---	---
DPB1*2501	---	---	---	---
DPB1*26011	---	---	---	---
DPB1*26012	---	---	---	---
DPB1*2701	---	---	---	---
DPB1*2801	---	---	---	---
DPB1*2901	---	---	---	---
DPB1*3001	---	---	---	---
DPB1*3101	---	---	---	---
DPB1*3201	---	---	---	---
DPB1*3301	---	---	---	---
DPB1*3401	---	---	---	---
DPB1*3501	---	---	---	---
DPB1*3601	---	---	---	---
DPB1*3701	---	---	---	---
DPB1*3901	---	---	---	---
DPB1*3901	---	---	---	---
DPB1*4001	---	---	---	---
DPB1*4101	---	---	---	---
DPB1*4401	---	---	---	---
DPB1*4501	---	---	---	---
DPB1*4601	---	---	---	---
DPB1*4701	---	---	---	---
DPB1*4801	---	---	---	---
DPB1*4901	---	---	---	---

Figura 10: continuación.

	80	90	100
DPB1*01011	CAG GAC AGG GTA TGC AGA CAC	CAG CTG GAC GAG GCC GTG ADC ATG CAG CGC CGA	GTC CAG CCT AAG GTG AAC GTT TCC CCC TCC
DPB1*01012	---	---	---
DPB1*02011	A-G	G-C A-	-G- -T-
DPB1*02012	A-G	G-C A-	-G- -T-
DPB1*0202	A-G	G-C A-	---
DPB1*0301	---	---	---
DPB1*0401	A-G	G-C A-	-G- -T-
DPB1*0402	---	---	---
DPB1*0501	A-G	G-C A-	-G- -T-
DPB1*0601	A-G	---	---
DPB1*0801	---	---	---
DPB1*0901	---	---	---
DPB1*1001	---	---	---
DPB1*11011	A-G	---	---
DPB1*11012	A-G	---	---
DPB1*1301	A-	---	---
DPB1*1401	---	---	---
DPB1*1501	A-G	---	---
DPB1*1601	A-G	---	---
DPB1*1701	A-G	---	---
DPB1*1801	A-G	---	---
DPB1*1901	---	---	---
DPB1*20011	A-G	---	---
DPB1*20012	A-G	---	---
DPB1*2101	A-G	---	---
DPB1*2201	A-G	---	---
DPB1*2301	A-G	---	---
DPB1*2401	A-G	---	---
DPB1*2501	---	---	---
DPB1*26011	---	---	---
DPB1*26012	---	---	---
DPB1*2701	A-G	---	---
DPB1*2801	A-G	---	---
DPB1*2901	---	---	---
DPB1*3001	A-G	---	---
DPB1*3101	A-G	---	---
DPB1*3201	A-G	---	---
DPB1*3301	A-G	---	---
DPB1*3401	A-G	---	---
DPB1*3501	---	---	---
DPB1*3601	A-G	---	---
DPB1*3701	---	---	---
DPB1*3801	A-G	---	---
DPB1*3901	A-G	---	---
DPB1*4001	A-G	---	---
DPB1*4101	A-G	---	---
DPB1*4401	---	---	---
DPB1*4501	---	---	---
DPB1*4601	A-G	---	---
DPB1*4701	A-G	---	---
DPB1*4801	A-G	---	---
DPB1*4901	A-G	---	---

Figura 10: continuación.

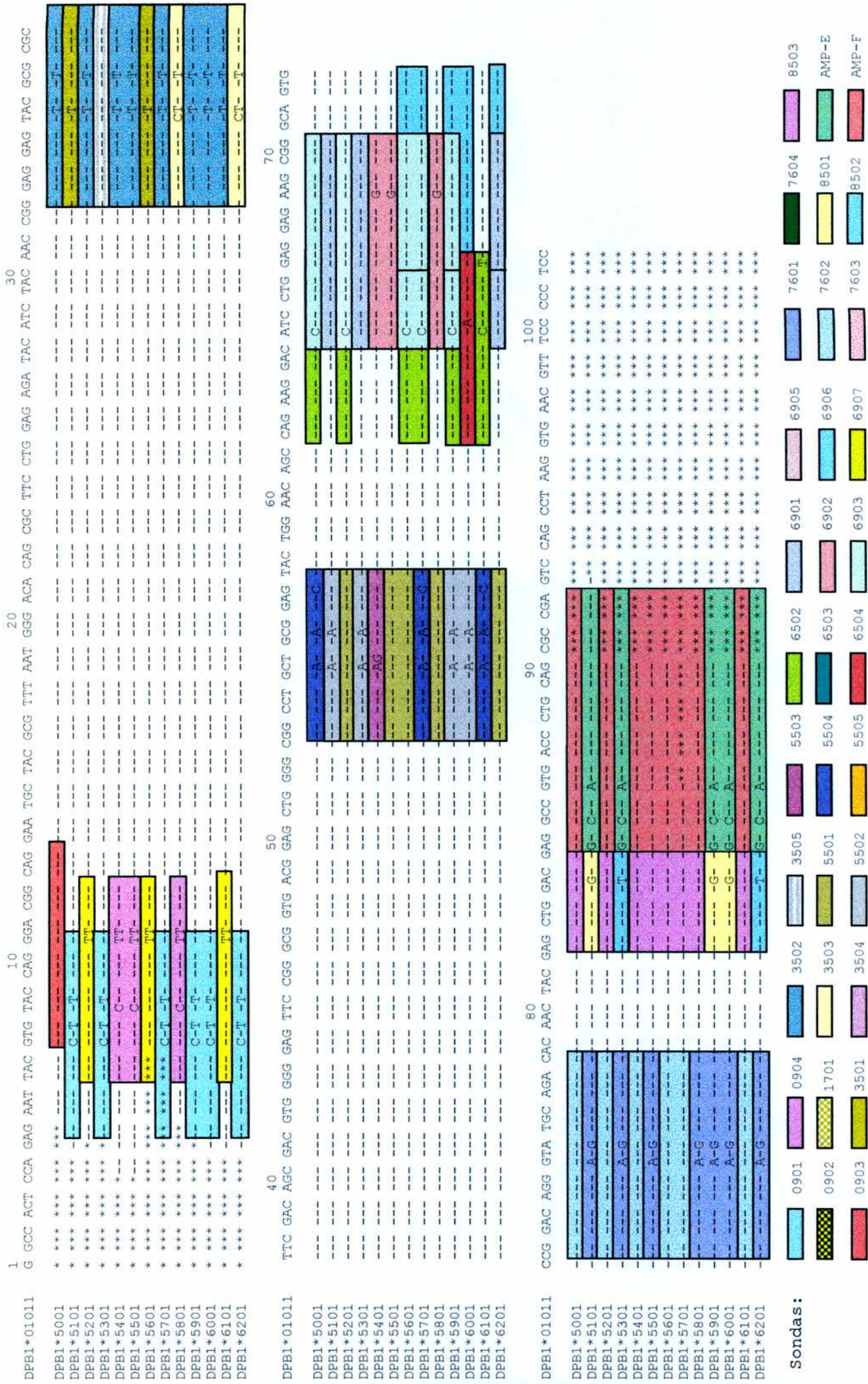


Figura 10: Continuación. Se muestran los nombres de cada sonda.

4.3- ESTUDIOS GENÉTICOS-POBLACIONALES Y ESTADÍSTICA

4.3.1- CÁLCULO DE FRECUENCIAS Y HAPLOTIPOS.

Las frecuencias antigénicas se calcularon para cada alelo como el número de individuos portadores de ese alelo (N antigénico) dividido el total de individuos de esa población. Las frecuencias alélicas o génicas corresponden a el número de individuos portadores de un determinado alelo más el número de homocigotas para ese alelo (N alélico) dividido el número total de alelos en la población. Ambos tipos de frecuencias se expresaron en porcentaje. Los alelos que no se pueden tipificar se agrupan en una categoría blancos, denominada X.

Las frecuencias de los haplotipos DRB1-DQB1-DPB1 se obtuvieron por el método de máxima verosimilitud por un procedimiento de conteo génico con el programa Arlequin. El desequilibrio de ligamiento se evaluó usando el índice D [33, 58, 59], donde:

$$D = x_i - p_i \cdot q_i$$

siendo

x_i : frecuencia observada del haplotipo i.

p_i y q_i : frecuencias de los alelos que constituyen el haplotipo i.

Este valor de D obtenido es dependiente de las frecuencias génicas p y q. Para poder comparar valores de desequilibrio entre diferentes poblaciones se usa el valor corregido D' el cual:

$$D' = \frac{D}{D_{\max}}$$

siendo D max el menor de $p(1-q)$ o $q(1-p)$ para $D > 0$, o el menor de pq o $(1-p)(1-q)$ para $D < 0$.

La significancia estadística del valor de D fue evaluada por el test del X^2 con un grado de libertad ($P < 0.05$) donde:

$$X^2 = Nr^2$$

y $r^2 = D^2 / pq(1-p)(1-q)$; N: es el tamaño de la muestra.

4.3.2- *TEST DE EWENS-WATTERSON.*

La realización de este test requiere que las poblaciones estén en equilibrio. Por este motivo, se determinó primero el hecho de que todas las poblaciones estudiadas estuvieran en equilibrio para el locus DPB1.

El estadístico de homocigosis observado (F obs) usado en el test de Ewens -Watterson se calcula como:

$$F \text{ obs} = \sum_{i=1}^k p_i^2$$

donde p_i es la frecuencia del alelo i de un determinado locus existiendo un total de k alelos.

Este valor se compara con el índice de homocigosis esperado en condiciones de neutralidad (F esp) para ese tamaño poblacional y ese k . También se calcula un índice de homocigosis mínimo que es igual a la inversa del número de alelos presente en cada población [27, 30].

Tanto el equilibrio de Hardy-Weinberg como el test de Ewens-Watterson se realizaron con el programa Arlequin.

4.3.3- *ANÁLISIS FILOGENÉTICO*

Se utilizaron las frecuencias génicas (o alélicas) de los loci de clase II DRB1-DQB1-DPB1 de 26 poblaciones diferentes para calcular una matriz de distancias genéticas. Para las poblaciones argentina, chiriguana y mapuche las frecuencias de los loci DRB1 y DQB1 fueron obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio por Marcelo Pando, quien gentilmente me prestó estos datos para incluirlos en el análisis. En estas mismas poblaciones las frecuencias del locus DPB1 se determinaron en el presente estudio. Los datos de las demás poblaciones utilizadas para la construcción de los dendogramas fueron sacados de la literatura [41]. Se incluyeron las siguientes poblaciones: siete poblaciones caucásicas (de Argentina, Estados Unidos, Canadá, Italia, Alemania, Francia y España); cuatro africanas (negros de

Sudáfrica, de Senegal, e individuos pertenecientes a los grupos étnicos San y Khoi); una australiana (Nueva Guinea); dos asiáticas (Japón y Corea); doce Amerindias (argentinas: Mataco-Wichi, Toba pigala, Toba del este, Mapuches, Chiriguano; mexicanas; Mixe, Mixteco, Zapoteco; brasileras: Kaingang, Xavante y Guaraní e indios norteamericanos).

Para el cálculo de las distancias se utilizó la fórmula de Nei, bajo la cual se asume que las diferencias entre las poblaciones se dan por deriva génica. Estas distancias están formuladas para un modelo de mutación de infinitos alelos, es decir, donde cada mutación de lugar a un alelo distinto. Se asume que todos los loci poseen la misma tasa de mutación neutra, y que la variabilidad genética inicial en una población está en equilibrio entre mutación y deriva génica, manteniéndose constante el tamaño efectivo de la población. La fórmula de Nei es:

$$D = - \ln \frac{\sum_m \sum_i p_{1mi} p_{2mi}}{[\sum_m \sum_i (p_{1mi})^2]^{1/2} [\sum_m \sum_i (p_{2mi})^2]^{1/2}}$$

donde m es la suma sobre los loci, i sobre los alelos en los m^{avo} loci y p_{1mi} es la frecuencia del i^{avo} alelo del m^{avo} loci en la población 1.

Para la construcción de los dendogramas se utilizaron dos métodos de agrupamiento que utilizan diferentes algoritmos, el método del vecino más próximo o neighbor-joining (NJ) y el unweighted pair grouping (UPG). En el primer método no se asume una tasa de evolución constante y se obtiene un árbol que carece de raíz. En el segundo caso, se asume una tasa de evolución constante. En ambos tipos de árboles el largo de las líneas horizontales es proporcional a las distancias genéticas entre las poblaciones.

También se realizó la técnica denominada Bootstrap, que le confiere validez estadística a los grupos que aparecen en los árboles filogenéticos. Se generan múltiples conjuntos de datos que son como remuestreos del conjunto de datos originales. En cada muestreo se quita un carácter al azar y se repite otro de manera que el total se mantiene constante. La variación que se obtiene analizando estas repeticiones es la típica variación que se espera de coleccionar nuevas muestras. Con cada conjunto de datos se crea una matriz de distancias (y por lo tanto un árbol) diferente. En un total de 100 repeticiones se obtiene el número (o porcentaje) de veces

que cada grupo del árbol aparece agrupado. Esta técnica testea la reproducibilidad de la secuencia de separaciones en el árbol.

La construcción de las matrices de distancia, de los dendogramas y la técnica de bootstrap fue realizado con el programa Phylip.

5. RESULTADOS

5.1- TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ALELOS HLA-DPB1

Se tipificaron los individuos de las poblaciones caucásicas argentina, Mataco-Wichi, Chiriguano y Mapuches por amplificación del exón 2 (PCR) y posterior hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO). La amplificación puede abarcar todos los alelos del locus o sólo algunos (dependiendo del par de primers usados) con lo que el patrón de hibridación se hace más fácil de analizar. Esta especificidad permite dividir a los alelos en dos grupos, el grupo A y el B, los cuales poseen distintas condiciones de amplificación que fueron puestas a punto para llegar a las óptimas (tabla5: Materiales y Métodos). Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (**fig. 11**)

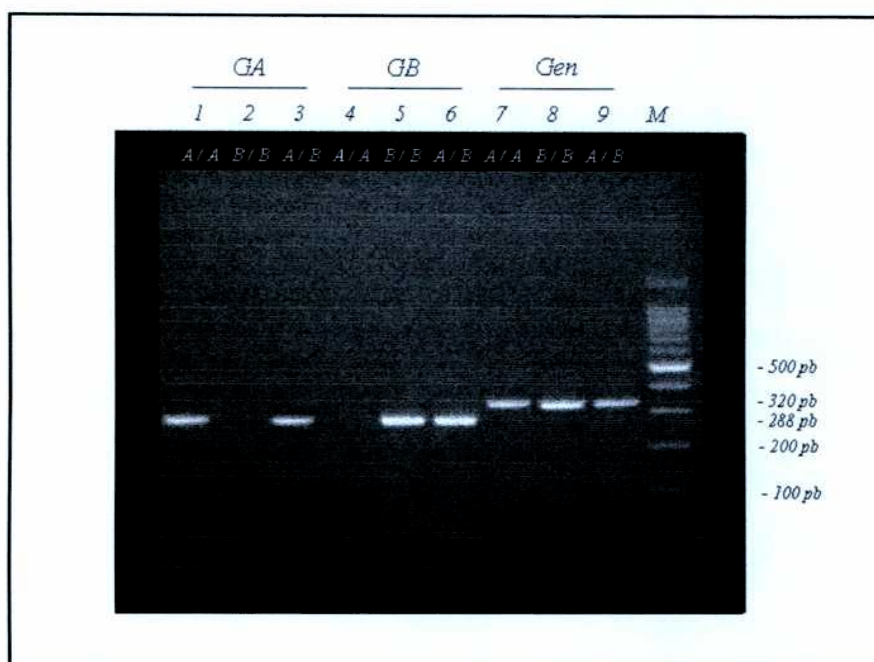


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR específicos para el grupo A (calles 1, 2 y 3), grupo B (calles 4, 5 y 6) y genéricos (calles 7, 8 y 9). Las muestras de las calles 1, 4 y 7 poseen los dos alelos del grupo A (no hay amplificación con los primers del grupo B); las de las calles 2, 5 y 8 poseen los dos alelos del grupo B (no hay amplificación con los primers del grupo A); las de las calles 3, 6 y 9 poseen un alelo del grupo A y otro del grupo B (amplifica con los tres pares de primers). M: marcador de peso molecular. Se indican los tamaños de los fragmentos amplificados en pares de bases (288 pb para las amplificaciones específicas y 320 pb para las genéricas).

La hibridación con los oligonucleótidos marcados con ^{32}P permitió asignar a cada muestra (luego de la autorradiografía) el alelo HLA-DPB1 correspondiente de acuerdo al patrón de pegado (**fig. 12**). No se observó ningún patrón de hibridación extraño al cual no pudiera asignársele un alelo de los actualmente conocidos.

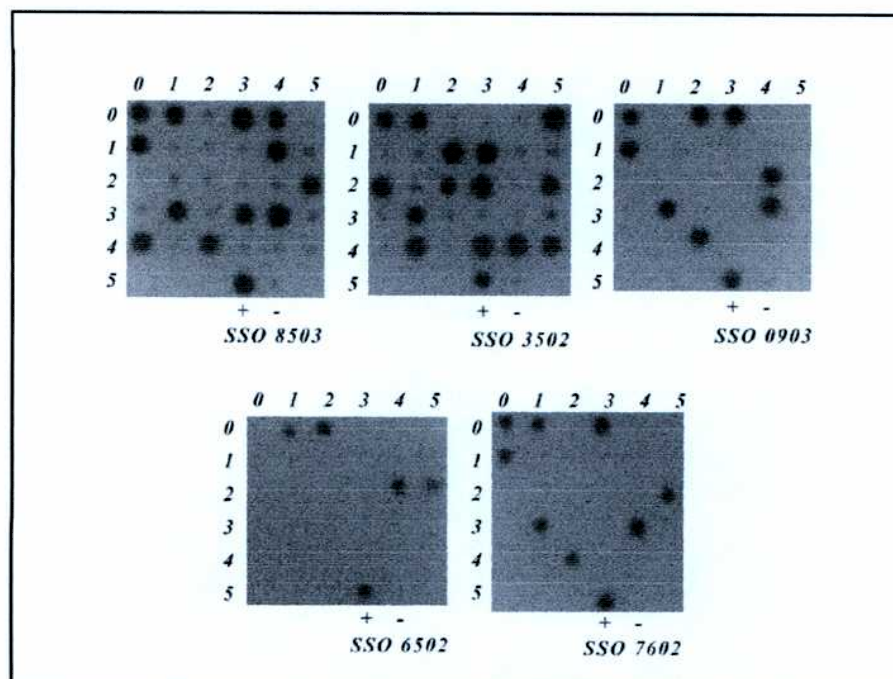


Figura 12: Autorradiografía de las membranas de nylon usadas para la tipificación de los alelos HLA-DPB1. Cada membrana corresponde a un SSO y cada muestra está repetida en todas las membranas en la misma posición. La lectura del patrón de positivos y negativos de cada muestra permite asignar el alelo correspondiente. +: control positivo de hibridación; -: control negativo de hibridación.

5.2- ANÁLISIS DE FRECUENCIAS

Una vez obtenida la tipificación de cada individuo se calcularon las frecuencias antigénicas y génicas o alélicas de las cuatro poblaciones analizadas (**tabla 7**). Como se puede ver en la población caucásica argentina se detectaron 19 alelos del locus DPB1 diferentes: DPB1*0101, *0201, *0202, *0301, *0401, *0402, *0501, *0601, *0901, *1001, *1101, *1301, *1401, *1501, *1701, *1801, *2301, *3301, *3401. De los 204 individuos estudiados, el 54.41% porta el alelo DPB1*0401; otros alelos frecuentes resultaron ser el DPB1*0402 (29.41%) y el *0201 (25.00 %). Las respectivas frecuencias de estos alelos son 32.35%, 16.67% y 13.24%.

Los alelos DPB1*0101 y *0301 aparecen con frecuencias mayores al 5% mientras que todos los demás alelos lo hacen con frecuencias menores. En siete individuos fue imposible tipificar uno de los alelos porque no se disponía de suficiente ADN ni de sangre para el estudio (X) (**Tabla 7-A**).

En los 19 indios Mataco-Wichis la diversidad alélica se redujo considerablemente, encontrándose sólo seis alelos. En este caso el alelo predominante es el DPB1*0402 con una frecuencia del 61.11%, seguido por el *0301. Frecuencias menores al 10% se encontraron para los alelos DPB1*0401, *0501, *1301 y *1701 (**Tabla 7-B**).

En la población de Chiriguano estudiada (49 individuos) se observó, al igual que en los Mataco-Wichi la predominancia del alelo DPB1*0402 en el 75.51% de los individuos (frecuencia alélica = 53.06%). El segundo alelo más frecuente resultó ser el DPB1*1301 (11.22%), seguido por el *0301 (7.14%). Cuatro individuos presentaron el alelo DPB1*2701 y uno el *2001, ambos ausentes en las demás poblaciones. Otros alelos observados en frecuencias cercanas o menores al 5% fueron el DPB1*0201, *0401, *0501, *1101, *1401, *1701 y *2301 sumando un total de doce variantes alélicas distintas. En dos individuos no pudo ser detectado uno de los alelos por falta de ADN o sangre (**tabla 7-C**).

Once alelos diferentes fueron encontrados en la población mapuche estudiada (47 individuos). Algunos de ellos (el DPB1*1601, *2501, *3501) resultan únicos ya que no están presentes en ninguna de las demás poblaciones. En este caso los alelos DPB1*0402 y *0401 se encuentran presentes con frecuencias altas y similares (30.85% y 27.66% respectivamente), seguidos por el *0201 cuya frecuencia es de 20.21% y el *0301 presente en el 23.40 de los individuos (frecuencia alélica = 12.77%) (**Tabla 7-D**).

Los alelos DPB1*0101, *0202, *0601, *0901, *1501 y *3401 resultan únicos de los individuos caucásicos ya que se encontraron ausentes en todas las poblaciones indígenas.

A) Caucásicos argentinos

Nº de individuos = 204; Nº de alelos = 408

<i>Alelo</i>	<i>N antigénico</i>	<i>Número de homocigotas</i>	<i>N alélico</i>	<i>Frecuencia antigénica (%)</i>	<i>Frecuencia alélica (%)</i>
0101	21	0	21	10.29	5.15
0201	51	3	54	25.00	13.24
0202	4	0	4	1.96	0.98
0301	33	1	34	16.18	8.33
0401	111	21	132	54.41	32.35
0402	60	8	68	29.41	16.67
0501	9	0	9	4.41	2.21
0601	6	0	6	2.94	1.47
0901	7	0	7	3.43	1.72
1001	14	0	14	6.86	3.43
1101	13	0	13	6.37	3.19
1301	9	0	9	4.41	2.21
1401	13	0	13	6.37	3.19
1501	1	0	1	0.49	0.25
1701	8	0	8	3.92	1.96
1901	3	0	3	1.47	0.74
2301	2	0	2	0.98	0.49
3301	2	0	2	0.98	0.49
3401	1	0	1	0.49	0.25
X	7	0	7	3.43	1.72

B) Mataco-Wichis

Nº de individuos = 18; Nº de alelos = 36

<i>Alelo</i>	<i>N antigénico</i>	<i>número de homocigotas</i>	<i>N alélico</i>	<i>Frecuencia antigénica (%)</i>	<i>Frecuencia alélica (%)</i>
0301	6	0	6	33.33	16.67
0401	2	1	3	11.11	8.33
0402	16	6	22	88.89	61.11
0501	3	0	3	16.67	8.33
1301	1	0	1	5.56	2.78
1701	1	0	1	5.56	2.78

C) Chiriguanos

Nº de individuos = 49; Nº de alelos = 98

<i>Alelo</i>	<i>N antigénico</i>	<i>número de homocigotas</i>	<i>N alélico</i>	<i>Frecuencia antigénica (%)</i>	<i>Frecuencia alélica (%)</i>
0201	1	0	1	2.04	1.02
0301	6	1	7	12.24	7.14
0401	5	0	5	10.20	5.10
0402	37	15	52	75.51	53.06
0501	5	0	5	10.20	5.10
1101	1	0	1	2.04	1.02
1301	11	0	11	22.45	11.22
1401	5	0	5	10.20	5.10
1701	3	0	3	6.12	3.06
2001	1	0	1	2.04	1.02
2301	1	0	1	2.04	1.02
2701	4	0	4	8.16	4.08
X	2	0	2	4.08	2.04

D) Mapuches

Nº de individuos = 47; Nº de alelos = 94

<i>Alelo</i>	<i>N antigénico</i>	<i>número de homocigotas</i>	<i>N alélico</i>	<i>Frecuencia antigénica (%)</i>	<i>Frecuencia alélica (%)</i>
0201	18	1	19	38.30	20.21
0301	11	1	12	23.40	12.77
0401	26	0	26	55.32	27.66
0402	27	2	29	57.45	30.85
0501	1	0	1	2.13	1.06
1001	1	0	1	2.13	1.06
1601	1	0	1	2.13	1.06
1901	1	0	1	2.13	1.06
2301	2	0	2	4.26	2.13
2501	1	0	1	2.13	1.06
3501	1	0	1	2.13	1.06

Tabla 7: Frecuencias antigénicas y génicas (o alélicas) encontradas en cuatro poblaciones normales argentinas para el locus HLA-DPB1. A) Individuos caucásicos argentinos; B) Mataco-Wichis; C) Chiriguanos; D) Mapuches. Se indica en negrita el o los alelos predominantes.

5.3- ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.

5.3.1- HAPLOTIPOS MÁS FRECUENTES.

Las frecuencias de los haplotipos DRB1-DQB1-DPB1 se obtuvieron por el método de máxima verosimilitud por un procedimiento de conteo génico con el programa Arlequin. Los resultados de los haplotipos más frecuentes en las poblaciones caucásica argentina, Chiriguano y Mapuches se muestran en la **tabla 8**. La población Mataco-Wichi no fue incluida en el análisis de haplotipos, así como tampoco en el de desequilibrio de ligamiento debido a que no se disponía de la tipificación del locus DRB1 ni de DQB1 necesaria. Al analizar haplotipos y debido a que los loci DRB1 y DQB1 se hallan en fuerte desequilibrio de ligamiento, generalmente se observa que un determinado alelo de DR aparece con un DQ particular. Este es el caso de el DRB1*0101 con el DQB1*0501, o del DRB1*0301 con el DQB1*0201 para citar algunos ejemplos. Como puede verse en la **tabla 8**, no ocurre lo mismo con el locus DP. Así, cada combinación DR-DQ aparece con varios posibles alelos de DPB1, generalmente con el *0401, *0402 o el *0201. Otro aspecto que se destaca, es que las poblaciones indígenas presentan reducida la cantidad de haplotipos y muchos de ellos no están presentes en la población caucásica, es decir, les son propios.

En los caucásicos argentinos el haplotipo más frecuentes es el DRB1*1501-DQB1*0602-DPB1*0401 seguido por el DRB1*0101-DQB1*0501-DPB1*0401. Estas y otras combinaciones observadas en esta población (DRB1*0701-DQB1*0201-DPB1*1101 ó *0201, DRB1*0301-DQB1*0201-DPB1*0101) son comunes entre los caucásicos. Excepciones son los haplotipos DRB1*0301-DQB1*0201-DPB1*0401 y el DRB1*0701-DQB1*0303-DPB1*0401 que si bien son frecuentes en los caucásicos argentinos, no lo son en otras poblaciones caucásicas [41]. Si bien el DRB1*1402-DQB1*0301-DPB1*0402 se encuentra en las tres poblaciones, en los indios su frecuencia es superior a la observada en los caucásicos y posiblemente en estos últimos, la presencia de este haplotipo sea contribución indígena.

Los estudios de haplotipos para indígenas que incluyen al locus HLA-DPB1 no han sido realizados hasta el momento. En los Chiriguanos las frecuencias más altas se observan para el DRB1*1602-DQB1*0301-DPB1*0402 y el DRB1*0407-DQB1*0301/0302-DPB1*0402. Ambos, junto con el DRB1*1406-DQB1*0301-DPB1*0402 han sido previamente observados en esta población teniendo en cuenta sólo DR/DQ. Una excepción la constituye el DRB1*1201-DQB1*0501-DPB1*1701, el cual no ha sido reportado anteriormente.

Un aporte original de este trabajo lo constituye el estudio de alelos HLA de individuos Mapuches. Los haplotipos DRB1*0407-DQB1*0302-DPB1*0401, DRB1*1602-DQB1*0301-DPB1*0401 son exclusivos de esta población a nivel de DPB1 ya que los DR/DQ que los componen son frecuentes en otras poblaciones Amerindias. Otra característica que incumbe sólo al locus DP se observa en DRB1*1101-DQB1*0301-DPB1*0201, DRB1*1104-DQB1*0301-DPB1*0201. Ambos se han encontrado en individuos caucásicos pero en combinación con el alelo DPB1*0401 en vez de con el *0201 como aquí se reporta. El haplotipo el DRB1*0101-DQB1*0501-DPB1*0402 también está presente en la población caucásica pero en este caso su frecuencia es mucho menor.

5.3.2- DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.

El desequilibrio de ligamiento se calculó entre el locus DQB1 y DPB1 para las poblaciones caucásica argentina, Chiriguanos y Mapuches; los resultados se muestran en la **tabla 9**. Para la población caucásica argentina sólo se presentan las combinaciones que mostraron desequilibrio de ligamiento significativo y en estos casos se corrigió el índice de desequilibrio D (para independizarlo de las frecuencias alélicas). Así, se observa que en esta población existen algunos alelos del locus DPB1 asociados a DQB1. Sólo dos de estas combinaciones han sido anteriormente descriptas (DQB1*0602-DPB1*0501 y DQB1*0201-DPB1*1101) siendo las demás propias de la población caucásica argentina (**tabla 9-A**).

Tanto en las población de Chiriguanos como de Mapuches los índices de desequilibrio de ligamiento para los diferentes haplotipos DQB1/DPB1 no resultaron significativos (**tabla 9-B y 9-C**).

<i>Haplotipos DRB1-DQB1-DPB1</i>	<i>Caucásicos argentinos (f)</i>	<i>Chiriguanos (f)</i>	<i>Mapuches (f)</i>
0101-0501-0201	0.011		
0101-0501-0401	0.034		
0101-0501-0402	0.002		0.094
0301-0201-0101	0.023		
0301-0201-0401	0.030		
0301-0201-0402	0.016		
0407-0301/0302 ⁺ -0402		0.027	
0407-0302-0401			0.121
0701-0201-0201	0.030		0.020
0701-0201-0402	0.026		
0701-0201-1101	0.023		
0701-0303-0401	0.014		
0801-0402-0401	0.011		
0802-0302-0402	0.011		
1101-0301-0201			0.052
1101-0301-0402	0.012		
1104-0301-0201			0.041
1104-0301-0402	0.011		
1201-0501-1701		0.018	
1301-0603-0401	0.016		
1302-0604-0402	0.014		
1402-0301-0402	0.011	0.045	0.042
1402-0301-0501		0.018	0.010
1406-0301-0402		0.013	
1501-0602-0301	0.011		
1501-0602-0401	0.048	0.009	
1601-0502-0401	0.011		
1602-0301-0401			0.084
1602-0301-0402	0.003	0.029	0.031

Tabla 8: Frecuencias (f) de los haplotipos más comunes de las poblaciones caucásica argentina, Chiriguanos y Mapuches. En negrita se muestran los dos haplotipos más frecuentes. ⁺ No se pudo definir cuál de estos dos alelos está involucrado en este haplotipo.

A) Caucásicos argentinos

<i>Haplotipo</i>	<i>x</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>D</i>	<i>r</i> ²	<i>X</i> ²	<i>P</i>	<i>D'</i>
0201 0202	0.008	0.209	0.010	0.006	0.025	4.485	0.034	0.817
0201 0401	0.022	0.209	0.324	-0.045	0.057	10.177	0.001	-0.672
0201 0402	0.057	0.209	0.167	0.022	0.022	3.926	0.048	0.170
0201 1101	0.025	0.209	0.032	0.018	0.065	11.688	0.001	0.723
0201 1701	0.017	0.209	0.020	0.013	0.051	9.060	0.003	0.817
0302 1401	0.011	0.048	0.032	0.010	0.066	11.753	0.001	0.317
0501 0401	0.050	0.091	0.324	0.020	0.023	4.129	0.042	0.332
0503 2301	0.003	0.027	0.005	0.003	0.056	9.989	0.002	0.558
06 0201	0.011	0.021	0.132	0.008	0.029	5.171	0.023	0.449
0602 0101	0.015	0.083	0.052	0.010	0.029	5.144	0.023	0.219
0602 0501	0.008	0.083	0.022	0.006	0.022	3.932	0.047	0.296
0603 3401	0.003	0.048	0.003	0.003	0.062	11.174	0.001	1.000

B) Chiriguano

<i>Haplotipo</i>	<i>x</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>D</i>	<i>r</i> ²	<i>X</i> ²
0201 0501	0.020	0.019	0.051	0.019	9.05.10-04	5.07.10-02*
0301 0401	0.020	0.442	0.051	-0.003	3.99.10-07	2.23.10-05*
0301 0402	0.200	0.442	0.531	-0.035	3.78.10-04	2.12.10-02*
0301 0501	0.020	0.442	0.051	-0.003	4.09.10-07	2.29.10-05*
0301 1301	0.100	0.442	0.112	0.050	3.19.10-04	1.78.10-02*
0301 1701	0.020	0.442	0.031	0.006	1.50.10-06	8.41.10-05*
0301 2701	0.060	0.442	0.041	0.042	8.69.10-05	4.86.10-03*
0301 0401	0.020	0.442	0.051	-0.003	3.99.10-07	2.23.10-05*
0301/0302 0401	0.020	0.135	0.051	0.013	5.37.10-05	3.01.10-03*
0301/0302 0402	0.120	0.135	0.531	0.049	3.78.10-03	2.12.10-01*
0301/0303 0402	0.020	0.019	0.531	0.010	1.26.10-03	7.06.10-02*
0302/0304 0402	0.020	0.019	0.531	0.010	1.26.10-03	7.04.10-02*
0303/0304 0201	0.020	0.135	0.010	0.019	2.25.10-05	1.26.10-03*
0303/0304 0402	0.080	0.135	0.531	0.009	1.17.10-04	6.54.10-03*
0303/0304 1401	0.040	0.135	0.051	0.033	3.42.10-04	1.91.10-02*
0402 0301	0.025	0.154	0.071	0.014	7.52.10-05	4.21.10-03*
0402 0402	0.100	0.154	0.531	0.018	4.58.10-04	2.56.10-02*
0501 1701	0.040	0.057	0.031	0.038	7.18.10-04	4.02.10-02*
0602 0402	0.020	0.019	0.531	0.010	1.23.10-03	6.86.10-02*

C) Mapuches

<i>Haplotipo</i>	<i>x</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>D</i>	<i>r</i> ²	<i>X</i> ²
0201 0201	0.021	0.052	0.202	0.010	3.13.10-04	1.50.10-02*
0201 1001	0.010	0.052	0.011	0.010	1.86.10-05	8.94.10-04*
0201 1601	0.010	0.052	0.011	0.010	1.86.10-05	8.94.10-04*
0201 1901	0.010	0.052	0.011	0.010	1.86.10-05	8.94.10-04*
0301 0201	0.153	0.470	0.202	0.058	6.04.10-04	2.90.10-02*
0301 0301	0.079	0.470	0.128	0.019	4.46.10-05	2.14.10-03*
0301 0401	0.112	0.470	0.277	-0.018	7.11.10-05	3.41.10-03*
0301 0402	0.080	0.470	0.309	-0.065	1.03.10-03	4.92.10-02*
0301 0501	0.010	0.470	0.011	0.005	3.50.10-07	1.68.10-05*
0301 2501	0.010	0.470	0.011	0.005	3.47.10-07	1.67.10-05*
0301 3501	0.010	0.470	0.011	0.005	3.45.10-07	1.65.10-05*
0302 0301	0.025	0.271	0.128	-0.009	2.60.10-05	1.25.10-03*
0302 0401	0.127	0.271	0.277	0.052	1.48.10-03	7.09.10-02*
0302 0402	0.097	0.271	0.309	0.014	1.09.10-04	5.22.10-03*
0402 0401	0.031	0.052	0.277	0.017	1.04.10-03	4.98.10-02*
0501 0402	0.094	0.094	0.309	0.065	8.62.10-03	4.14.10-01*
0602 0402	0.010	0.021	0.309	0.004	1.55.10-04	7.42.10-03*
0602 2301	0.010	0.021	0.021	0.010	9.67.10-05	4.64.10-03*
0603 0301	0.010	0.031	0.128	0.006	1.45.10-04	6.98.10-03*
0603 0401	0.010	0.031	0.277	0.002	2.13.10-05	1.02.10-03*
0603 2301	0.010	0.031	0.021	0.010	6.21.10-05	2.98.10-03*

Tabla 9: Desequilibrio de ligamiento DQB1-DPB1 en las poblaciones caucásica argentina (A), Chiriguano (B) y Mapuches (C). Para los caucásicos argentinos de todas las combinaciones DQB1-DPB1, sólo se muestran las que mostraron desequilibrio de ligamiento significativo y en ellas se calculó el D'. Para las otras dos poblaciones (Mapuches y Chiriguano) se muestran todas las combinaciones obtenidas. Como no se disponía de los datos de DQB1 de los Mataco-Wichi no pudo analizarse el desequilibrio de ligamiento en esta población. * P no significativo.

5.4- TEST DE NEUTRALIDAD DE EWENS-WATTERSON

Previamente, y como condición necesaria para realizar este test, se determinó si las poblaciones estudiadas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus DPB1 utilizando el programa Arlequin. Las cuatro poblaciones fueron halladas en equilibrio, satisfaciendo la ley de Hardy-Weinberg. De esta forma, fue posible postular que el total de individuos homocigotas en cada población es igual a la suma de los cuadrados de las frecuencias génicas de los diferentes alelos, postulado requerido para realizar el test de neutralidad de Ewens-Watterson.

En este test se determina si las frecuencias de los homocigotas para las distintas poblaciones son similares a las esperadas en condiciones de neutralidad selectiva. Para la obtención de los índices de homocigosis observado y esperado (F_{obs} y F_{esp} respectivamente), así como para evaluar si existían diferencias significativas entre ambos se utilizó el programa Arlequin. Para las poblaciones estudiadas aquí el estadístico de homocigosis calculado no difiere significativamente del esperado en la neutralidad. Además, como estos índices dependen del número de alelos se calculó el cociente $F_{esp}/F_{mín}$ para poder comparar la homocigosis entre las poblaciones independizándonos del número de alelos presentes en cada una de ellas (tabla 10). Estos cocientes no presentan diferencias notorias entre las diferentes poblaciones para el locus DPB1.

	<i>Caucásicos argentinos</i>	<i>Mataco-Wichi</i>	<i>Chiriguanos</i>	<i>Mapuches</i>
<i>F observada</i>	0.165	0.417	0.310	0.230
<i>F esperada</i>	0.187	0.350	0.203	0.244
<i>p</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>F mínima</i>	0.050	0.167	0.083	0.091
<i>Nº alelos</i>	20	6	12	11
<i>F esp/F mín</i>	3.740	2.095	2.446	2.681

Tabla 10: Índices de homocigosis observada, esperada en condiciones de neutralidad y mínima ($1/N^{\circ}$ alelos) para las distintas poblaciones estudiadas. El cociente $F_{esp}/F_{mín}$ es el índice de homocigosis relativa al mínimo teórico de homocigosis de este locus en cada población. n.s.: diferencia entre F_{obs} y F_{esp} no significativa.

5.5- ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los dendogramas fueron contruïdos utilizando las frecuencias génicas de los loci de clase II DRB1, DQB1 y DPB1. Veintiseis poblaciones de distintos lugares fueron incluïdas en el análisis: siete poblaciones caucásicas (de Argentina, Estados Unidos, Canadá, Italia, Alemania, Francia y España); cuatro africanas (negros de Sudáfrica, de Senegal, e individuos pertenecientes a los grupos étnicos San y Khoi); una australiana (Nueva Guinea); dos asiáticas (Japón y Corea); doce Amerindias (argentinas: Mataco-Wichi, Toba pigala, Toba del este, Mapuches, Chiriguanos; mexicanas; Mixe, Mixteco, Zapoteco; brasileras: Kaingang, Xavante y Guaran  e indios norteamericanos). Las frecuencias utilizadas en el análisis para los caucásicos argentinos, Chiriguanos y Mapuches corresponden a las obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio para DRB1 y DQB1 y en este estudio para DPB1. Para las demás poblaciones los datos de frecuencias de los diferentes loci corresponden a los reportados en el 11  Workshop de Histocompatibilidad [41]. Las distancias utilizadas fueron las de Nei, aunque al usar las de Cavalli-Sforza los dendogramas no presentaron variaciones (datos no mostrados). También se realizó un método de remuestreo denominado bootstrap, que confiere validez estadística a los árboles obtenidos. Esta herramienta permite asignar para cada agrupación obtenida en el árbol, un porcentaje que indica cuántas veces aparece un determinado grupo de poblaciones agrupado en el total de bootstraps realizados (repeticiones). Para obtener las distancias (**tabla 11**), el bootstrap y para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el programa Phylip. Los dendogramas obtenidos usando los métodos UPG y NJ se muestran en la **figura 12-A y -B** respectivamente.

En el dendograma obtenido por el método UPG encontramos que la primer divergencia da lugar a dos grupos bien definidos, uno conteniendo a todos los Amerindios y a los Senegaleses y el otro a los demás grupos étnicos. Ambos grupos aparecen en el 28% de los bootstraps. Dentro del grupo Amerindio encontramos algunos aspectos interesantes; los indios Mataco-Wichi, Toba del este y Toba pigala (todos del norte argentino) se encuentran agrupados compartiendo un ancestro común con los Xavantes, Mixe, Mixteco y Zapoteco (México y centro de Brasil). Si bien el bootstrap de todo el grupo es sólo del 20%, el subgrupo argentino aparece en un 59% de las repeticiones realizadas y el otro subgrupo en el 70%. Las

semejanzas observadas entre los Mapuches y los indios norteamericanos (los cuales uno esperaría que estuvieran ubicados con el grupo mexicano) pueden parecer extrañas,. Este grupo se observa en el 100% de los bootstraps. Los Chiriguano (norte argentino), Guaraní y Kaingang (ambos del sur de Brasil) se encuentran constituyendo ramas independientes. Para esta gran agrupación exclusiva de indios se obtiene un valor de bootstrap muy alto, del 84%. Esto estaría evidenciando que realmente existen semejanzas entre los indígenas de América.

Por otra parte, los caucásicos están formando parte de un grupo en donde las poblaciones más semejantes parecen ser italianos y argentinos, franceses y canadienses, españoles y estadounidenses. Si bien en los dos primeros casos la historia está de acuerdo con estos datos, en el último las semejanzas son cuestionables. Este grupo caucásico (bootstrap=100%) compartiría un ancestro con los australianos que conforman su propia rama aislada de las demás. Luego divergen los africanos y por último los asiáticos. Para todas las separaciones anteriores a la que da origen a los caucásicos por un lado y guineos por el otro, se obtienen valores de bootstrap menores al 30%.

Con el método de NJ se obtiene un dendograma con muchas características similares al obtenido por el método UPG. Debe recordarse que con el NJ se obtiene un árbol sin raíz y la misma puede encontrarse en cualquier parte. En este caso, un aspecto destacable está dado por la separación que se da entre los indígenas mexicanos y brasileños de los indios argentinos. La misma se obtiene en el 69% de las repeticiones. Dentro del último grupo, los que habitan en el norte argentino están separados de los Mapuches. Los indios norteamericanos se encuentran, en este caso también, muy cercanos a los Mapuches. Al igual que en el dendograma anterior, los senegaleses constituyen un grupo aislados y cercanos al de los indios. Los caucásicos se hallan junto con los asiáticos y australianos, mientras que los africanos se agrupan separadamente próximos al grupo caucásico-asiático. El valor de bootstrap del grupo caucásico es del 63%, pero hay que tener en cuenta que dentro del mismo también se encuentran los asiáticos y guineos.

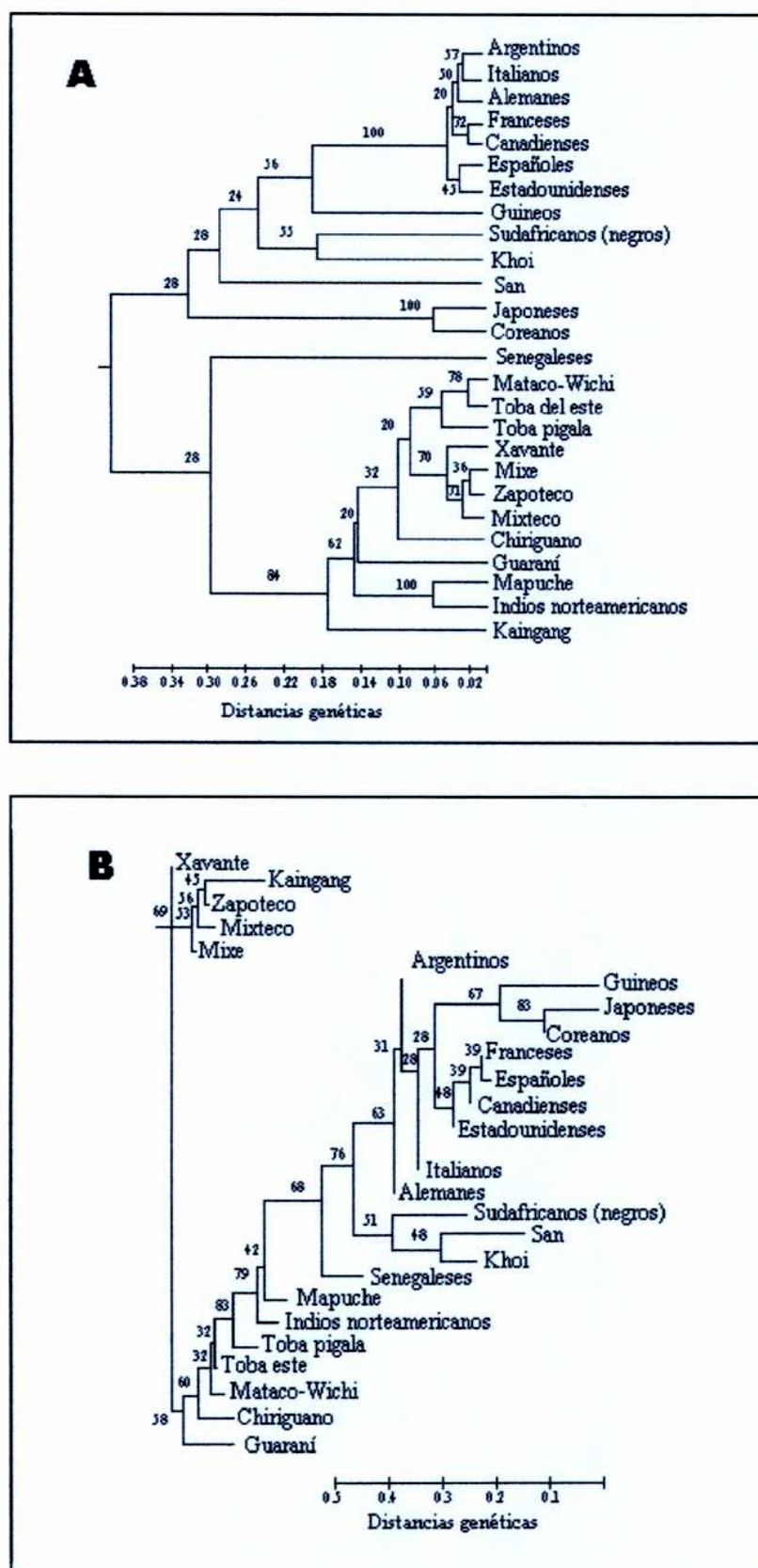


Figura12: Dendogramas contruídos por el método UPG (A) y el NJ (B) mostrando las relaciones entre 26 grupos étnicos basándose en las frecuencias alélicas de los loci de clase II DRB1,DQB1 y DPB1. Al lado de cada rama se muestra el número de veces (en %) que aparece en el bootstrap el grupo consistente en las poblaciones que se encuentran a la izquierda de esa rama

Argentina	0.000	0.398	0.456	0.442	0.824	0.427	0.052	0.058	0.037	0.089	0.055	0.084	0.725	0.351	0.643	0.460	0.687	0.802	0.370	0.737	0.992	0.825	0.670	0.869	0.637	0.389
Sudáfrica		0.000	0.456	0.754	1.093	0.696	0.423	0.485	0.420	0.511	0.476	0.469	0.843	0.725	0.843	0.651	0.802	0.884	0.707	0.989	0.905	0.880	0.832	0.921	0.577	0.373
Senegal			0.000	1.034	1.038	0.789	0.540	0.442	0.376	0.578	0.511	0.543	0.476	0.417	0.489	0.444	0.517	0.497	0.478	0.522	0.962	0.624	0.626	0.720	1.025	0.885
N. Guinea				0.000	0.543	0.462	0.377	0.341	0.396	0.462	0.430	0.368	1.452	0.764	1.262	0.915	1.489	1.654	0.804	1.260	1.800	1.739	1.481	1.848	1.107	0.743
Japón					0.000	0.126	0.995	0.871	0.858	0.933	0.862	0.956	0.918	0.915	0.983	0.642	0.925	1.180	0.935	1.250	1.389	1.253	1.155	1.176	1.376	1.026
Corea						0.000	0.497	0.472	0.474	0.421	0.385	0.469	0.954	0.736	0.964	0.557	0.918	1.244	0.688	1.192	1.529	1.282	1.100	1.169	0.892	0.621
Francia							0.000	0.056	0.042	0.052	0.065	0.032	1.011	0.391	0.978	0.619	0.910	1.097	0.423	0.874	1.273	1.188	0.896	1.168	0.606	0.513
Alemania								0.000	0.049	0.114	0.056	0.057	0.693	0.289	0.642	0.477	0.680	0.773	0.284	0.641	1.031	0.861	0.682	0.905	0.538	0.502
Italia									0.000	0.104	0.083	0.083	0.744	0.293	0.678	0.498	0.709	0.807	0.391	0.684	1.122	0.896	0.736	0.949	0.763	0.565
España										0.000	0.050	0.067	1.133	0.497	1.081	0.637	1.027	1.296	0.473	1.033	1.424	1.359	1.053	1.300	0.602	0.467
USA											0.000	0.070	0.844	0.433	0.722	0.545	0.816	0.973	0.383	0.852	1.156	0.975	0.811	1.009	0.547	0.352
Canada												0.000	0.950	0.404	0.973	0.557	0.849	1.051	0.370	0.819	1.252	1.152	0.853	1.113	0.500	0.481
Wichis													0.000	0.338	0.147	0.122	0.041	0.090	0.263	0.337	0.309	0.156	0.129	0.171	1.109	0.967
Mapuches														0.000	0.401	0.291	0.294	0.297	0.123	0.315	0.665	0.357	0.288	0.286	0.880	1.005
Chiriguanos															0.000	0.266	0.215	0.143	0.406	0.310	0.505	0.161	0.239	0.284	1.449	0.821
Toba pigala																0.000	0.085	0.289	0.225	0.396	0.486	0.320	0.261	0.266	0.900	0.751
Toba este																	0.000	0.128	0.224	0.301	0.260	0.130	0.088	0.096	0.977	0.984
Xavantes																		0.000	0.306	0.210	0.265	0.062	0.080	0.126	1.317	1.078
Indios norteam																			0.000	0.414	0.519	0.367	0.249	0.252	0.603	0.807
Guarani																				0.000	0.490	0.260	0.255	0.338	1.181	1.331
Kaingang																					0.000	0.206	0.169	0.253	1.194	1.024
Mixe																						0.000	0.045	0.054	1.302	0.884
Zapoteco																							0.000	0.053	0.992	0.875
Mixteco																								0.000	1.060	0.974
San																									0.000	0.491
Khói																										0.000

Tabla II: Matriz de distancias obtenida para 26 poblaciones a partir de las frecuencias génicas o alélicas de los loci de clase II DRB1-DQB1-DPB1. Las distancias se calcularon según Nei (ver Materiales y Métodos). Las poblaciones analizadas son: argentinos, estadounidenses, canadienses, italianos, alemanes, franceses, españoles, negros de Sudáfrica, senegaleses, San, Khoi, guineos, japoneses, coreanos e indígenas: Mataco-Wichi, Toba pigala, Toba del este, Mapuches, Chiriguanos, Mixe, Mixteco, Zapoteco, Kaingang, Xavante, Guaraní e indios norteamericanos

6. DISCUSIÓN

En el panel de individuos caucásicos argentinos se encontraron 19 alelos diferentes para el locus HLA-DPB1 siendo el predominante el DPB1*0401, seguido por el *0402, *0201, *0301 y *0101. Esta distribución de frecuencias tiene forma de J invertida, con el alelo predominante en una frecuencia muy alta (32.35%) y los demás con frecuencias bastante inferiores (la frecuencia del *0402, el segundo alelo predominante, cae a la mitad y las frecuencias son aún menores para los demás alelos). Por otro lado, el orden de predominancia de los alelos en esta población es muy similar al encontrado en poblaciones caucásicas en general, y es particularmente semejante al de los italianos, lo cual no es extraño si se considera que los individuos que constituyen este panel poseen ancestros españoles, italianos o argentinos. Esta semejanza es visible en los árboles filogenéticos contruídos a partir de los loci de clase II donde los argentinos y los italianos se agrupan juntos. Los alelos presentes en frecuencias menores también se encuentran representados en otras poblaciones caucásicas con frecuencias similares [41].

En todos los grupos indígenas estudiados se observó una disminución en la diversidad alélica, que si bien no fue tan marcada para los Mapuches y Chiriguano, donde se encontraron 11 y 12 alelos respectivamente, resultó significativamente reducida a 6 alelos en la población Mataco-Wichi. Podría pensarse que esta reducción en el polimorfismo HLA es un artificio, resultado de un tamaño muestral pequeño; sin embargo otros estudios hechos en esta población conteniendo un mayor número de individuos también revelan esta restricción tan marcada en la diversidad de los alelos del locus HLA-DPB1 [45, 47]. Teniendo en cuenta que esta es una población bastante cerrada, con poca mezcla de individuos pertenecientes a otros grupos, la poca variabilidad alélica observada resulta un fenómeno concebible. A pesar de que poseíamos pocos individuos de esta población para estudiar, nos pareció interesante incluirlos en el análisis aunque sea para tener una aproximación de los fenómenos que en ella están ocurriendo.

La restricción en la variabilidad de los alelos HLA en las poblaciones indígenas argentinas puede deberse a reducciones drásticas en el tamaño poblacional (cuellos de botella) durante las migraciones que dieron lugar a la colonización de América, o al relativo aislamiento de los grupos indígenas en los cuales la deriva génica puede hacerse importante. Tampoco hay que descartar enfermedades masivas o factores ambientales donde la selección direccional pudiera actuar en favor de ciertos alelos. Si bien estas explicaciones no son mutuamente

excluyentes, los alelos que faltan en las poblaciones argentinas presentadas aquí (DPB1*0101, *0202, *0601, *1501) están ausentes en todos los grupos Amerindios estudiados hasta el momento, por lo que la explicación más factible de este fenómeno serían los cuellos de botella producidos durante la colonización, en vez de la deriva génica.

Otro resultado compartido por todas las poblaciones indígenas fue la predominancia del alelo DPB1*0402. Este alelo es el más frecuente en todos los Amerindios, un aspecto único de este locus, ya que el alelo predominante para los otros loci de clase II varía según la población indígena analizada [45, 46, 62]. Lo más probable es que este alelo estuviera presente en la población fundadora de los grupos indígenas.

En los Mapuches de Blancura Centro (al igual que en los indios de Norte América) se observa que el alelo DPB1*0401 tiene una frecuencia levemente inferior a la del *0402 (27.66% para el primero y 30.85% para el segundo), es decir, en este casos encontramos dos alelos predominantes. La semejanza con los indios norteamericanos también se revela en los dendogramas contruídos, donde estos dos grupos aparecen juntos. Una explicación poco probable de esta semejanza es que ambos grupos hallan estado sometidos a similares presiones selectivas. Por otro lado, estudios realizados para otros marcadores genéticos sobre la misma población Mapuche de Blancura Centro, revelan cierta mezcla, producto de la existencia de flujo génico desde poblaciones caucasoides [68, 69]. La alta frecuencia del alelo DPB1*0401, típicamente caucásico, podría ser una consecuencia de este fenómeno, que también pudo haber ocurrido en los indios norteamericanos causando las similitudes observadas.

En la población Mataco-Wichi estudiada aquí, se encuentran algunas diferencias comparándola con estudios previos realizados sobre la misma población. En los mismos, el alelo DPB1*0201 se encuentra en una frecuencia considerable a diferencia de lo que aparece en este trabajo donde no fue detectado. Por otro lado, nosotros encontramos el alelo DPB1*1701 que no estuvo presente en las poblaciones Mataco-Wichi estudiadas anteriormente [45,47]. Estas diferencias, al igual que las producidas en los valores de las frecuencias entre ambos estudios, podrían deberse a efectos azarosos causados por el pequeño tamaño muestral utilizado en este trabajo.

En la población de Chiriguanos, el segundo alelo más frecuente fue el DPB1*1301 (11.22%). Si bien este alelo está presente en otras poblaciones indígenas y caucásicas, la frecuencia del mismo es baja, encontrándose en frecuencias más significativas en poblaciones del sudeste asiático [42]. Este alelo podría ser también proveniente de la población fundadora de los Amerindios.

Los resultados también revelan la presencia en los grupos indígenas de alelos que resultan raros o están ausentes en otras poblaciones. Cabe destacar el alelo DPB1*2701 que se observa en el 8.16% de los Chiriguanos. Este alelo ha sido encontrado sólo en otras dos poblaciones indígenas: Tobas y Guaraníes. En el primer grupo con una frecuencia de 4% y en los Guaraníes (como segundo alelo predominante) con una frecuencia de 24.7% [45, 62]. Este alelo también se encontró en la población de Gambia (oeste de África), Nueva Guinea (Australia) y en los afro-americanos [63]. Otros alelos que resultan infrecuentes son el DPB1*2501 y el DPB1*3501 hallados en la población Mapuche. El primero no está presente en ninguna otra población Amerindia, aunque ha sido encontrado en españoles, portugueses y griegos. El segundo fue reportado en tres poblaciones indígenas de Colombia, aunque sólo en una de ellas en una frecuencia alta (población Kogui con una frecuencia alélica del 27%); también en portugueses y griegos [46, 64].

El estudio de los haplotipos más frecuentes revela semejanzas entre los caucásicos argentinos con otras poblaciones caucásicas [41]. Sin embargo existen algunos aspectos dignos de destacar. El DRB1*1402 y el *1602 son alelos típicamente indígenas. Sin embargo, en nuestra población caucásica los haplotipos que incluyen estos alelos se encuentran presentes, aunque en baja frecuencia. Cabe suponer que estos haplotipos son contribución indígena. Por otro lado el haplotipo DRB1*0701-DQB1*0303-DPB1*0401 ha sido reportado sólo en alemanes y podría provenir de esta población que se encuentra próxima a los argentinos en los dendogramas construidos. El alto desequilibrio de ligamiento entre DR y DQ hace que en el estudio de haplotipos siempre aparezca la misma combinación de estos dos loci, es decir, un determinado DR se encuentra asociado a un determinado DQ. Pero estas mismas combinaciones aparecen con varios alelos del locus DP. Debido a este fenómeno se decidió estudiar el desequilibrio de ligamiento entre los loci DQB1 y DPB1 que se discutirá en breve.

En los grupos indígenas se observan haplotipos que incluyen alelos que les son propios. Esto ocurre a nivel de DR más específicamente. En este estudio para los Chiriguano los haplotipos encontrados coinciden con los reportados anteriormente salvo una excepción [62]. El DRB1*1201-DQB1*0501-DPB1*1701 no ha sido reportado en indios y posiblemente sea una contribución caucásica al igual que el DRB1*1501-DQB1*0602-DPB1*0401, debido a que ambos haplotipos se observan en caucásicos. Esto no resulta extraño si consideramos el grado de mezcla que existe en los Chiriguano cuya estimación resulta del 13% [62]. En los Mapuches encontramos también haplotipos que son exclusivos de ellos. En algunos casos los mismos coinciden con los pertenecientes a otros grupos indígenas (los que incluyen al DRB1*0407, al *1402 y al *1602). Sin embargo, el DRB1*0101-DQB1*0501-DPB1*0402 es raro en indios y en otros grupos. Otro aspecto interesante viene dado por los haplotipos que incluyen al DR 11. Mientras que en caucásicos encontramos la combinación DRB1*1101/*1104-DQB1*0301-DPB1*0402 en los Mapuches se observa que estos DRB1/DQB1 aparecen con el DPB1*0201 a pesar de que el DPB1*0402 es un alelo frecuente en esta población. Esto puede deberse a posibles ventajas selectivas o a que no ha pasado suficiente tiempo como para diluir esta asociación por recombinación.

La relevancia de estudiar el desequilibrio de ligamiento radica en que este fenómeno puede estar revelando la presencia de fuerzas selectivas que mantienen juntos a los loci en cuestión. Los estudios que involucran al locus DPB1 han dado resultados variables. En la mayoría, se revelan asociaciones nulas o bajas entre DP y DQ o DR. Esto se explica por lo presencia de dos hot spots de recombinación que existen entre los loci DQ y DP [32, 39]. Por otro lado, se han observado haplotipos B-DR con fuertes desequilibrios de ligamiento. Sin embargo, la fracción de recombinación entre el locus B y DR es incluso mayor a la reportada entre DR y DP y además la distancia que separa a B de DR es mayor a la que separa a DR de DP (aproximadamente 1250kb en el primer caso y 400kb en el segundo) [30]. Dado que el desequilibrio de ligamiento es inversamente proporcional a la distancia de separación de los genes, se esperaría mayor desequilibrio entre DR-DP. Para explicar este hecho se ha propuesto que la recombinación entre B y DR es haplotipo dependiente (es decir, los haplotipos que se encuentran en desequilibrio de ligamiento presentan menos recombinación que otros haplotipos), lo que no ocurriría entre DR y DP [32, 65]. En este estudio se encuentra que en la población caucásica algunas combinaciones DQB1-DPB1 poseen índices de desequilibrio de ligamiento significativos. Existen algunos mecanismos que pueden causar

desequilibrio de ligamiento, además de las posibles ventajas selectivas de mantener juntos a los loci y la corta distancia de separación de genes anteriormente nombrada. Estos pueden ser el hecho de un incorrecto muestreo, donde el panel de individuos testeados tengan alguna relación de parentesco, y la mezcla, producto del flujo génico entre diferentes poblaciones [66]. Tomando en cuenta los estudios anteriores y debido a que al formar nuestro panel de caucásicos argentinos se tuvo especial cuidado de elegir individuos no relacionados, y que esta población es, de hecho, una mezcla de inmigrantes que ingresaron a nuestro país a partir del siglo XVI, el desequilibrio observado podría ser producto de esta mezcla más que de fuerzas selectivas actuando sobre esta población. Más aún, si tenemos en cuenta que en las poblaciones indígenas analizadas en este estudio (Chiriguano y Mapuches), que se encuentran en este territorio desde hace mucho tiempo, no se han encontrado asociaciones significativas entre DQ y DP.

Existen varios indicios de la selección natural actuando sobre un gen, muchos de los cuales se confirman para DRB1 y DQB1. Una distribución de frecuencias donde los alelos poseen frecuencias similares, la alta persistencia de los alelos a través de los sucesos de especiación (hipótesis transespecífica), índices de homocigosis desviados de lo esperado en neutralidad, desequilibrio de ligamiento, relaciones entre tasas de sustituciones no sinónimas a sinónimas (dn/ds) mayores que uno, son algunos de los aspectos que se tienen en cuenta a la hora de hablar de selección en los genes de histocompatibilidad, muchos discutidos en la introducción de este trabajo. J. Klein por un lado y H. A. Erlich por el otro poseen posiciones encontradas respecto a la selección sobre el locus DPB1. El primero postula que el locus DP evoluciona en condiciones relativamente neutras y que esta región podría estar desapareciendo funcionalmente (“... may be phasing out functionally”) [16]. Para sacar estas conclusiones se basa en la gran estabilidad de la región DP a nivel de composición, número de genes y distancias entre los mismos, en el hecho de que el coeficiente de selección estimado para DP resulta el menor comparado con los demás loci HLA, en que no existe persistencia de alelos en el tiempo [12, 22, 23]. Erlich se basa en el cálculo de la relación tasa de sustituciones no sinónimas a sinónimas en los sitios de presentación antigénica, donde se obtiene en el linaje humano un resultado de 200 comparado con lo que se observa en otros homínidos (entre 1 y 3). Así, postula que en el humano existe una intensa selección operando sobre el locus HLA-DPB1 [21]. El análisis de tasa de sustituciones no fue posible efectuarlo, ya que nosotros no secuenciamos alelos y sólo detectamos diferencias no sinónimas entre los

mismos. Al obtener índices de homocigosis para el locus DP de cada población observamos que los mismos no se alejaban significativamente de los esperados en condiciones de neutralidad selectiva. Además recordemos que las distribuciones de frecuencias de las diferentes poblaciones tienen forma de J invertida, lo que no se condice con la presencia de selección equilibradora. Con esta evidencia no podemos decir que la típica selección operando sobre los demás loci estaría actuando sobre DP en estas poblaciones y estaría de acuerdo con lo postulado por Klein. Si bien gran parte de la evidencia sugiere la ausencia de selección es indudable que un dn/ds de 200 no puede ser ignorado. Sucesivos estudios podrán quizá aclarar este confuso cuadro sobre el locus DPB1.

La reconstrucción de la filogenia humana ha sido hecha a partir de datos arqueológicos, lingüísticos, y genéticos (mitocondriales y nucleares). En todos estos estudios el análisis indica que la primera divergencia en la evolución humana separó a los africanos de los no africanos. La segunda fisión separó a los australianos y asiáticos del sudeste de eurasiáticos, que en una tercera etapa de divergencia dieron lugar a los caucásicos por un lado y a los asiáticos del noreste y amerindios por el otro [67-69]. Los mismos resultados han sido obtenidos cuando los árboles filogenéticos se construyeron a partir de los datos serológicos de los genes de clase I HLA-A y B, aunque se encuentran algunas variaciones si los genes de clase II son utilizados para el análisis [70]. Si bien los dendogramas obtenidos en este estudio no encajan perfectamente en este esquema esto puede deberse a que sobre los genes HLA, más evidentemente sobre DR y DQ, estaría actuando la selección, y el polimorfismo en los loci HLA no es neutral; por otra parte los genes DR y DQ se encuentran en desequilibrio de ligamiento, es decir, no serían independientes uno de otro; por último, en algunas de las poblaciones usadas para la construcción de los árboles (sobre todo las africanas) muchos alelos no han podido ser detectados, es decir los blancos (X) son muy altos. Por otra parte, algunas de las poblaciones que vemos actualmente pueden estar altamente influenciadas por la mezcla, producto del flujo génico entre poblaciones. Estos efectos en conjunto, podrían estar causando desviaciones en la reconstrucción de la filogenia humana a partir de genes HLA de clase II. Los datos que confirman el hecho de que algunos conjuntos de poblaciones no se encuentran bien agrupados son los obtenidos en el bootstrap. Se puede ver en el árbol del método UPG que el grupo que incluye a los caucásicos africanos y asiáticos fue obtenido como tal en un 28%.

Igualmente, existen algunos aspectos muy interesantes que se desprenden de este análisis dando resultados de bootstrap muy buenos. El grupo de los caucásicos se agrupa en el 100% de los árboles constituyendo un grupo bien establecido. Los indígenas no sólo forman un grupo bien determinado (bootstrap = 84%) sino que además son muy divergentes del resto de las poblaciones. Si bien es posible que en muchos casos exista flujo génico desde otras poblaciones, los indios han mantenido su “identidad” a nivel de los genes de clase II. Dentro de este gran grupo existen subgrupos interesantes. Si bien parecieran descender de un tronco común los Mataco-Wichi y Tobas divergen de los Mixteco, Mixe, Zapoteco y Xavantes. El primer grupo está compuesto por poblaciones del norte argentino, mientras que en el segundo encontramos tribus pertenecientes a México y el centro de Brasil. Los Kaingang, ubicados en el sur de Brasil son los primeros en divergir quizá sometidos a alguna presión de selección particular que los afectó. Los Chiriguano también aparecen aislados en una rama independiente habiendo divergido posteriormente que los Mapuches y los Guaraníes. En un estudio hecho sobre el sistema ABO en tribus indígenas argentinas se obtienen dendogramas muy parecidos al que aquí se presenta en los siguientes aspectos: los Mapuche divergen antes que los demás indígenas argentinos; los Chiriguano se encuentran formando un grupo con los Chanés (grupo no incluido en este análisis); los Toba y Mataco-Wichi se encuentran agrupados [71].

Como conclusión de este trabajo puede decirse que en los individuos caucásicos se observan frecuencias y haplotipos que se encuentran en otras poblaciones caucásicas con alguna contribución indígena, que involucra al locus DR principalmente. En los indígenas, como ocurre para las demás moléculas de histocompatibilidad, encontramos una reducción en la diversidad alélica del locus HLA-DPB1 con un predominio del alelo DPB1*0402. Este alelo es el más frecuente en todas las poblaciones Amerindias por lo que habría estado presente en la población fundadora. También se revela cierta mezcla proveniente de los caucásicos. En el análisis de haplotipos se observa que cada combinación DR/DQ aparece con varios alelos (los más frecuentes) del locus DP. El desequilibrio observado en los caucásicos se atribuye a la composición de este panel, mezcla de individuos con ancestros italianos, españoles y criollos. No se encontraron asociaciones DQ/DP en los indios. Los estudios filogenéticos revelan un grupo interesante compuesto por los indígenas, muy divergente de los demás. Las fuerzas selectivas actuando sobre el locus HLA-DPB1 no serían similares a las que actúan sobre otros genes de histocompatibilidad, donde la selección

equilibradora es la que mantiene el polimorfismo. En las poblaciones analizadas parecería que DP es más bien neutro a nivel de selección. En la historia evolutiva del locus HLA-DPB1 quedan algunos puntos por aclarar que no cuadran en este esquema de neutralidad selectiva.

7. REFERENCIAS

1. Brown, J. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 364: 33 (1993).
2. Bjorkman P.J. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature*, 329: 506 (1987).
3. Madden, D. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self peptides bound in an extended conformation. *Nature*, 353: 321 (1991).
4. Falk, K. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing and general rules. *Immunogenetics*, 39: 230 (1994).
5. Falk, K. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290 (1991).
6. Steimle, V. Regulation of MHC class II expression by IFN γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*, 256: 106 (1994).
7. Wei, X. Differential expression of HLA-E, HLA-F and HLA-G transcripts in human tissue. *Human Immunology*, 29: 131 (1990).
8. Bodmer, J. G. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigen* 49: 297 (1997).
9. Fernández-Viña, M. DNA typing for class II HLA antigens with Allele specific or group specific amplification . Typing for 24 alleles of HLA-DP. *Human Immunology* 30: 60 (1991).
10. Brodsky, F. M. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigen* 47: 464 (1996).
11. Hughes, A.L. Evolutionary relationships of class II major-histocompatibility-complex genes in mammals. *Molecular Biology Evolution* 7(6): 491 (1990).
12. Klein, J. Different modes of MHC evolution in primates. *Molecular Biology Evolution* 10(1): 48 (1993).
13. Figueroa, F. The origin of primate MHC-DRB genes and allelic lineages as deduced from the study of prosimians. *Journal of Immunology* 152: 4455 (1994).
14. Kenter, M. Evolutionary relationships among the primate MHC-DQA1 and DQA2 alleles. *Immunogenetics* 36: 71 (1992).
15. Otting, N. MHC-DQB repertoire variation in hominoid and Old World primates species. *The Journal of Immunology* 149: 461 (1992).
16. Grahovac, B. Conservative evolution of the MHC-DP region in anthropoid primates. *Human Immunology* 37: 75 (1993).

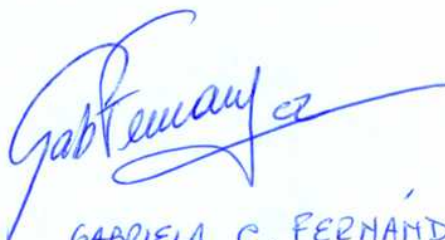
- 17.Mayer, W.E. Trans-species origin of MHC-DRB polymorphism in the chimpanzee. *Immunogenetics* 37: 12 (1992).
- 18.Andersson, L. Evolution of MHC polymorphism: extensive sharing of sequence motifs between human and bovine DRB alleles. *Immunogenetics* 33: 188 (1991).
- 19.McDevitt, H. Evolution of MHC class II allelic diversity. *Immunological Reviews* 143: 113 (1995).
- 20.Otting, N. Evolution of the Major Histocompatibility Complex DPA1 locus in primates. *Human Immunology* 42: 184 (1995).
- 21.Gyllensten, U. Rapid allelic diversification and intensified selection at antigen recognition sites of the MHC class II DPB1 locus during hominoid evolution. *Tissue Antigen* 47: 212 (1996).
- 22.Slierendregt, B. L. Allelic diversity at the MHC-DP locus in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Immunogenetics* 41: 29 (1995).
- 23.Satta, Y. Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 91: 7184 (1994).
- 24.Andersson, L. Generation of MHC class II diversity by intra and intergenic recombination. *Immunological Reviews* 143: 5 (1995).
- 25.Andersson, L. Concerted evolution in a segment of the first domain of polymorphic MHC class II B loci. *Immunogenetics* 33: 235 (1991).
- 26.Hedrick, P. W. Evolutionary genetics of the Major Histocompatibility Complex. *The American Naturalist* 143: 945 (1994).
- 27.Klein, J. The molecular descent of the Major Histocompatibility Complex. *Annual Review of Immunology* 11: 269 (1993).
- 28.Potts, W.K. Pathogen based models favoring MHC genetic diversity. *Immunological Reviews* 143: 181 (1995).
- 29.Bergström, T. Evolution of MHC class II polymorphism: the rise and fall of class II gene function in primates. *Immunological Reviews* 143: 13 (1995).
- 30.Begovich, A.B. Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *The Journal of Immunology* 148: 249 (1992).
- 31.Baisch, J. M. Linkage disequilibrium within the HLA complex does not extend into HLA-DP. *Scandinavian Journal of Immunology* 37: 499 (1993).
- 32.Tomsen, M. Localization of the recombination points in a family with two DR/DP recombinations. *Tissue Antigen* 47: 492 (1996).

33. Carrington, M. Major Histocompatibility Complex Class II haplotypes and linkage disequilibrium values observed in the CEPH families. *Human Immunology* 41: 234 (1994).
34. Bugawan, T. A combination of a particular HLA-DP β allele and an HLA-DQ heterodimer confers susceptibility to coeliac disease. *Nature* 339: 470 (1989).
35. Paul, C. Immunogenetics of juvenile chronic arthritis. *Tissue Antigen* 45: 280 (1995).
36. Ploski, R. Interaction between HLA-DP and between HLA and interleukin 1 α in juvenile rheumatoid arthritis indicates heterogeneity of pathogenic mechanisms of the disease. *Human Immunology* 42: 343 (1995).
37. Steiner, L. Two new DPB1 alleles identified in a study of the genetics of susceptibility to pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Tissue Antigen* 49: 262 (1997).
38. Ploski, R. Association to HLA-DRB1*08, HLA-DPB1*0301 and homozygosity for an HLA-linked proteasome gene in juvenile ankylosing spondylitis. *Human Immunology* 44: 88 (1995).
39. Djilali-Saiah, I. Linkage disequilibrium between HLA class II (DR, DQ, DP) and antigen processing (LMP, TAP, DM) genes of the Major Histocompatibility Complex. *Tissue Antigen* 48: 87 (1996).
40. Al-Daccak, R. Gene polymorphism of HLA-DPB1 and DPA1 loci in Caucasoid population: frequencies and DPB1-DPA1 associations. *Human Immunology* 31:277 (1991).
41. Kimiyoshi, T. HLA 1991. Proceedings of the eleventh international histocompatibility workshop and conference. Oxford University Press, vol 1: 1065 (1992).
42. Chandanayingyong, D. HLA-DPB1 polymorphism in the Thais of Southeast Asia. *Human Immunology* 40: 20 (1994).
43. Parham, P. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272: 67 (1996).
44. Gao, X. Diversity in HLA-DR4-related DR, DQ haplotypes in Australia, Oceania and China. *Human Immunology* 32: 269 (1991).
45. Cerna, M. Differences in HLA class II alleles of isolated South American Indian populations from Brazil and Argentina. *Human Immunology* 31, 213 (1993).
46. Trachtenberg, E. Results of expedition humana. I. Analysis of class II (DRB1-DQA1-DQB1-DPB1) alleles and SR-DQ haplotypes in nine Amerindian populations from Colombia. *Tissue Antigen* 48: 174 (1996).

- 47.Vullo, C. HLA polymorphism in a Mataco South American Indian tribe: serology of Class I and II antigens. Molecular analysis of class II polymorphic variants. *Human Immunology* 35: 209 (1992).
- 48.Shaw, S. Evidence for a new segregant series of B-cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogeneic proliferative and cytotoxic responses. *Journal of Experimental Medicine* 152: 565 (1980).
- 49.Dormoy, A. Complexity of the HLA-DP region: RFLP analysis versus PLT typing and oligotyping. *Human Immunology* 34: 39 (1992).
- 50.Maeda, M. A simple and rapid method for HLA-DP genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele-specific restriction endonucleasas. *Human Immunology* 27: 111 (1990).
- 51.Angelini, G. HLA-DP typing by DNA amplification and hybridization with specific oligonucleotides. *Human Immunology* 26: 169 (1989).
- 52.Otten, H.G. Serology versus PCR-SSP in typing for HLA-DR and HLA-DQ: a practical evaluation. *Tissue Antigen* 45: 36 (1995).
- 53.Sorrentino, R. Detection of complex alleles by direct analysis of DNA heteroduplexes. *Immunogenetics* 33: 118 (1991).
- 54.Hoshino, S. Polymerase chain reaction-Single strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a simple, economical and rapid method for histocompatibility testing. *Human Immunology* 33: 98 (1992).
- 55.Versluis, L. Ambiguous DPB1 alleles combinations resolved by direct sequencing of selectively amplified alleles. *Tissue Antigen* 46: 345 (1995).
- 56.Martínez Sarasola, C. Nuestros paisanos los indios. Buenos Aires. Emece Ed. 1992.
- 57.Canals Frau, S. Las poblaciones indígenas de la Argentina. Buenos Aires. Hipamérica Ed. 1986.
- 58.Lewontin, R.C. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120 :849 (1988).
- 59.Dausset, J. A haplotype study of HLA complex with special reference to the HLA-DR series and to Bf.C2 and glyoxalase I polymorphisms. *Tissue Antigen* 12: 297 (1978).
- 60.Carnese, F.R. Grupos ssanguíneos en una población mapuche de Blancura Centro, provincia de Río Negro, Argentina. *Bol. Soc. Esp. Antrop. Biol* 14:31 (1993).
- 61.Carnese, F.R. Demography and blood genetics of argentinian mapuche indians. *International Journal of Anthropology* (1994).

62. Petzl-Erler, M.L. Anthropology component report for region latin-America: Amerindian and admixed populations. HLA.Proceedings of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference. France. EDK, vol 1: 337. 1997
63. Moonsamy, P.V. Genetic diversity within the HLA class II region: ten new DPB1 alleles and their population distribution. Tissue Antigen 40: 153 (1992).
64. Charron, D. HLA.Proceedings of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference. France. EDK, vol 1: 723. 1997
65. Gregersen, P.K. Recombination sites in the HLA class II region are haplotype dependent. The Journal of Immunology 141: 1365 (1988).
66. Ott J. Analysis of human genetic linkage. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London. Cap. 11: 230 (1987).
67. Cavalli-Sforza, L.L. Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archaeological and linguistic data. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 85: 6002 (1988).
68. Bowcock, A.M. Drift, admixture and selection in human evolution: a study with DNA polymorphisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 88: 839 (1991).
69. Bailliet, G. Founder mitochondrial haplotypes in amerindian populations. American Journal of Human Genetics. 54: 27 (1994).
70. Imanishi, T. Genetic relationships among various human populations indicates by MHC polymorphisms. HLA 1991. Proceedings of the eleventh international histocompatibility workshop and conference. Oxford University Press, vol 1: 627 (1992).
71. Carnese, F.R. Distancias genéticas en poblaciones aborígenes de la Argentina. X Congreso Latinoamericano de Genética. Río de Janeiro, 1992.


Dr. LEONARDO FAIBOIM
ref. Titular Dpto. Microbiología
Jefe Lab. Inmunogenética
res. Docencia e Investigación


GABRIELA C. FERNÁNDEZ
L.V 156/91

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Leonardo Satz, no sólo por haberme aceptado para formar parte de su team sino también por su predisposición y atención para responder a cualquier cuestionamiento con la serenidad y lucidez que lo caracterizaban.

Al Dr. Leonardo Fainboim por hacerse cargo de esta tesina y por su fortaleza .

Al futuro e inminente Dr. Marcelo Pando, a quien le debo muchísimo y quien se ha ganado mi admiración, infinita gratitud y cariño, por haber contestado desde la pregunta más gila hasta la más brillante (?). Por haber estado siempre para ayudarme y darme aliento. Por haberme enseñado desde lo que es una pipeta automática hasta tomarse las cosas con cierta filosofía. Por ser mi apoyo y... me voy a poner a llorar a si que mejor la corto.

A todo el HLA Dream Team: Moni por su fuerza interior; Nancy por su buena onda permanente; Livio por sus ganas de superación constantes; July por su ayuda y por su alegría; a Marce por su darse siempre. Todas estas cosas que contagian y ayudan a seguir adelante. El sólo hecho de haber conocido gente tan linda, hace que mi paso por el lab haya sido mucho más enriquecedor que todo el conocimiento que pude haber adquirido.

A toda la gente del lab, por su interés y su ayuda.

A mi familia, mis viejos, mi hermana y mi cuñado por ser un aliento permanente, y a pesar de que ellos no lo sepan de mi boca, aceptar mis desiciones, mis silencios y mis histerias hacen que les esté totalmente agradecida. Los quiero un montón.

A mis amigas del alma, las malengas: la Pil que desde los once años compartimos aventuras, inquietudes, expectativas, menos novios, todo; la Flory porque estar cinco minutos con ella es refrescarse y por su alegría ontagiable; la Guada que siempre se hace un rato para vernos y por su voluntad incansable. Mil cosas podrían decirse de las malengas pero se me ocurre una sólo, las re quiero y llegó el viernes, chico!!

A mis amigos de la facu: Estani por su locura ingeniosa, Dieguito por su ternura, Tom por su fuerza, Kary por muchas horas compartidas de café y charla, Bar por su interés y ganas de superarse. Por muestras preocupaciones sobre el futuro compartidas espero que dentro de muchos años cada uno haya logrado lo que quiere.

A Diego.

A las chicas del cole: Pao, Romi, July, Amalia y Vicky. Por muchos pero muchos años y recuerdos que siempre van a estar.

A Esteban Hasson por su tiempo y su predisposición y a Federico de PCI.

A todos gracias y los re-quiero.