

Tesis de Licenciatura

Tipificación molecular del locus HLA-C en diversas poblaciones que habitan la República Argentina

Barrientos, Paula

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:

Barrientos, Paula. (). Tipificación molecular del locus HLA-C en diversas poblaciones que habitan la República Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000671_Barrientos

Cita tipo Chicago:

Barrientos, Paula. "Tipificación molecular del locus HLA-C en diversas poblaciones que habitan la República Argentina". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000671_Barrientos

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



*“Tipificación molecular del locus HLA-C en
diversas poblaciones que habitan la República
Argentina”*

Autor: Paula Barrionuevo

*Directores: Marcos Leonardo Satz
Leonardo Fainboim*

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

Nº0671

Marzo de 1999

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
1- Resumen	1
2- Introducción	3
2.1- Estructura, distribución y función de las moléculas de histocompatibilidad	3
2.2- Organización genética y polimorfismo del sistema HLA	9
2.3- Procesamiento y presentación antigénica	14
2.3.1- Vía exógena o endocítica	14
2.3.2- Vía endógena o biosintética	16
2.4- Evolución del MHC de clase I	18
2.4.1- Generación del polimorfismo	18
2.4.2- Mantenimiento del plimorfismo	20
2.5- HLA y genética poblacional	25
2.5.1- Haplotipos y desequilibrio de ligamiento	25
2.5.2- Frecuencia de los alelos del locus HLA-C en distintas poblaciones	27
2.6- HLA y respuesta alogeneica	29
2.7- Tipificación del sistema HLA	29
3- Objetivos	34
4- Materiales y métodos	35
4.1- Panel de individuos a tipificar	35
4.2- Tipificación molecular de los alelos HLA-C por PCR-SSO	35
4.2.1- Extracción de ADN genómico	36
4.2.2- Amplificación por PCR	36
4.2.3- Hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO)	39
4.2.3.1- Preparación y siembra de las membranas	39
4.2.3.2- Marcación de las sondas oligonucleotídicas	39
4.2.3.3- Hibridación de las membranas	39
4.3- Comparación entre la tipificación por serología y por PCR-SSO	44
4.4- Estudios genético-poblacionales y estadística	44
4.4.1- Cálculo de frecuencias antigénicas y alélicas	44
4.4.2- Cálculo de haplotipos y desequilibrio de ligamiento	45
4.4.3- Test de Ewens-Watterson	46

4.4.4- Análisis filogenéticos	46
5- Resultados	49
5.1- Tipificación molecular de los alelos del locus HLA-C	49
5.2- Comparación entre la tipificación por serología y por PCR-SSO	51
5.3- Análisis de frecuencias	51
5.4- Análisis de haplotipos	57
5.4.1- Haplotipos más frecuentes	57
5.4.2- Desequilibrio de ligamiento	60
5.5- Test de neutralidad de Ewens-Watterson	62
5.6- Análisis filogenéticos	63
6- Discusión	67
7- Bibliografía	77

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARS	Sitios de reconocimiento antigenico
CD	Cluster de diferenciación
CLIP	Péptido de cadena invariante asociado a clase II
CML	Cultivo mixto linfocitario
dN	Sustituciones no sinónimas
dS	Sustituciones sinónimas
HLA	Antígeno leucocitario humano
HVR	Regiones hipervariables
m.a.	Millones de años
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NJ	<i>Neighbor joining</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OTU	Unidad taxonómica operativa
RFLP	Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción
RSCA	Análisis de conformación mediado por una cadena de referencia
SSCP	Polimorfismo conformacional de simple cadena
SSO	Oligonucleótidos específicos de secuencia
SSP	<i>Primers</i> específicos de secuencia
TAP	Transportadores asociados con el procesamiento antigenico
TCR	Receptor de célula T
TNF	Factor de necrosis tumoral
UPGMA	<i>Unweighted Pairs-Group Method using arithmetic Averages</i>

Agradecimientos

Al Dr. Leonardo Satz, al cual admiro no sólo por haber sido un investigador brillante sino también una persona maravillosa, por haberme aceptado para formar parte de su laboratorio y despertar en mí un gran interés por la ciencia.

Al Dr. Leonardo Fainboim por haber aceptado la dirección de esta tesina.

A Graciela Theiler, a quien le debo muchísimo y se ha ganado todo mi cariño, por haberme enseñado absolutamente todo lo experimental, desde un gelcito 2% hasta hibridar quichicientas membranas a la vez, con una predisposición sin igual. Por ser mi apoyo y haber estado siempre para ayudarme y alentarme. Por las correcciones de este trabajo y por ser esa "persona espectacular" que todos queremos tener por maestra.

Al Dr. Marcelo Pando, al cual adoro y extraño, por su gran interés y haberme enseñado a usar los "inéditos" programas Arlequín y Phylip, los cuales permitieron que este trabajo tomara forma.

A Gra y Marce juntos porque sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

A Alejandra Cherniavsky con la cual me identifico y por la cual siento un profundo respeto, por valorarme y ser mi refugio en momentos difíciles. Por la corrección de esta tesis.

A mi compañera de emociones, Andrea Rubio, por ser mi cable a tierra permitiéndome estar al tanto de las becas, subsidios, cheques, papelería y todas esas cosas burocráticas, que de lo contrario nunca sabría. Por su solidaridad y transmitirme alegría. Porque su presencia me resulta fundamental en el lab. y por ser más que una compañera de trabajo, una gran amiga.

A todas las personas del Lab. por su interés y porque de una forma u otra absolutamente todos me ayudaron en éste trabajo.

A mis viejos por el entusiasmo y la fuerza que me transmiten día a día. Por apoyarme en este y en cada uno de los proyectos que emprendo.

A Liliana y Andy por preocuparse por mí y hacerme sentir como en casa incluso en momentos difíciles como éste.

A mis amigas del alma, Lau y Agus, a las cuales quiero con locura, por estar cada vez que se las necesita. Por su cariño, interés y ayuda. Por hacerme pasar momentos increíbles. Por haberlas conocido.

A mis amigos de la Facu (Faltan Todos-Chacón): Dario, Agus, Lau Nicoli, Mati, Lau Asseo, Leo, Poli, Marian ("la vaca"), la Cordo, Marina, Ale, Juan, Juli, Gaby, Agata, Marian Tanuz y Gus, con los cuales comparto millones de cosas y espero seguir

compartiendo. Por hacer que estos años de carrera, por el momento, sean los mejores de la vida.

A Javi, al cual amo, por acompañarme en cada segundo de esta tesis. Por su ayuda incondicional. Por soportarme las histerias, llantos y angustias de estos últimos tiempos. Por ser lo mejor que me pasó.

1. Resumen

La complejidad alélica de los loci HLA-DRB1, DRB3, DQA1, DQB1 y DPB1 en distintas poblaciones normales argentinas ya fue estudiada en nuestro laboratorio. En los caucásicos de Buenos Aires y suburbios, 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 HLA-C también podría tener características distintivas en las poblaciones a ser analizadas. Para poner a prueba esta hipótesis se tipificaron los alelos del locus HLA-C por una técnica molecular 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, 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 HLA-C es similar a la encontrada para otras poblaciones caucásicas. Los Chiriguano y Wichis poseen una distribución de frecuencias característica de poblaciones amerindias, donde se observa una reducción de la variabilidad y la presencia de alelos no encontrados (o en muy baja frecuencia) en poblaciones caucásicas, como el Cw*0303. Además, estas poblaciones comparten la mayoría de sus alelos con poblaciones del noreste asiático. En la población de Mapuches 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, el locus HLA-C ha sido el menos estudiado en cuanto a su historia evolutiva, teniéndose por tal motivo un gran desconocimiento de los mecanismos que permiten mantener su polimorfismo. 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 que se obtuvo (con unos pocos alelos predominantes), sugieren la ausencia de selección actuando sobre este locus en estas poblaciones. También se estudió el desequilibrio de ligamiento entre DRB1/DQB1 y C, el mismo resultó significativo en los Chiriguano y Wichis lo que podría ser reflejo de su ventaja selectiva.

Los estudios de frecuencias de loci polimórficos pueden utilizarse para reconstruir la filogenia humana. Se construyeron fenogramas a partir de las frecuencias alélicas del locus HLA-C para las poblaciones estudiadas aquí y otras 17 poblaciones. En los mismos se observaron dos grupos bien definidos, uno conteniendo a los indígenas americanos (excepto los Mapuches) y las poblaciones del noreste asiático, y el otro compuesto por los caucásicos, algunas poblaciones africanas y los Mapuches.

2. Introducción

2.1- Estructura, distribución y función de las moléculas de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad en el hombre (llamado sistema HLA) y en otros vertebrados superiores, codifica para una serie de glicoproteínas de superficie celular que participan en la presentación de péptidos antigenicos para la activación de los linfocitos T [1]. Este complejo, está codificado por un conjunto de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 y es altamente polimórfico. También se encuentran codificadas dentro del MHC otras moléculas, muchas de ellas con funciones inmunes, que se denominan moléculas de clase III.

Existen dos tipos de moléculas presentadoras de antígenos en este sistema: las moléculas de histocompatibilidad de clase I y las de clase II.

Las moléculas de clase I están constituidas por dos cadenas polipeptídicas, una llamada α o cadena pesada, de aproximadamente 340 aminoácidos y un peso molecular de 42-44 kD y una cadena pequeña no polimórfica de 12 kD (99 aminoácidos) unida no covalentemente, denominada $\beta 2$ - microglobulina (**Fig. 1-A**). Esta última no se encuentra codificada dentro del complejo mayor de histocompatibilidad. La cadena α se divide en tres dominios proteicos globulares de 90 aminoácidos cada uno, expuestos hacia el exterior de la célula. El que contiene el extremo N-terminal se denomina $\alpha 1$ y junto con el $\alpha 2$ determinan el sitio de unión al péptido o sitio de presentación antigenica; el dominio $\alpha 3$ 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 hidrofilicos donde se encuentra el extremo C-terminal. El dominio $\alpha 3$ y la $\beta 2$ -microglobulina poseen homología en la secuencia aminoacídica y estructural con los dominios constantes de las inmunoglobulinas. En los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ encontramos puentes disulfuro intracatenarios que estabilizan la molécula.

Las moléculas de clase II, al igual que las de clase I, también poseen dos cadenas, una α de 229 aminoácidos (32-34 kD) y una β de 237 aminoácidos (28-29 kD), unidas no

covalentemente (**Fig. 1-B**). 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 una cola citoplasmática de longitud variable según el producto, 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 α_2 y β_2 , y éstos, al igual que los dominios α_3 y β_2 -microglobulina de las moléculas de clase I, presentan homología con los dominios constantes de las inmunoglobulinas. Los dominios α_2 , β_1 y β_2 poseen puentes disulfuro intracatenarios.

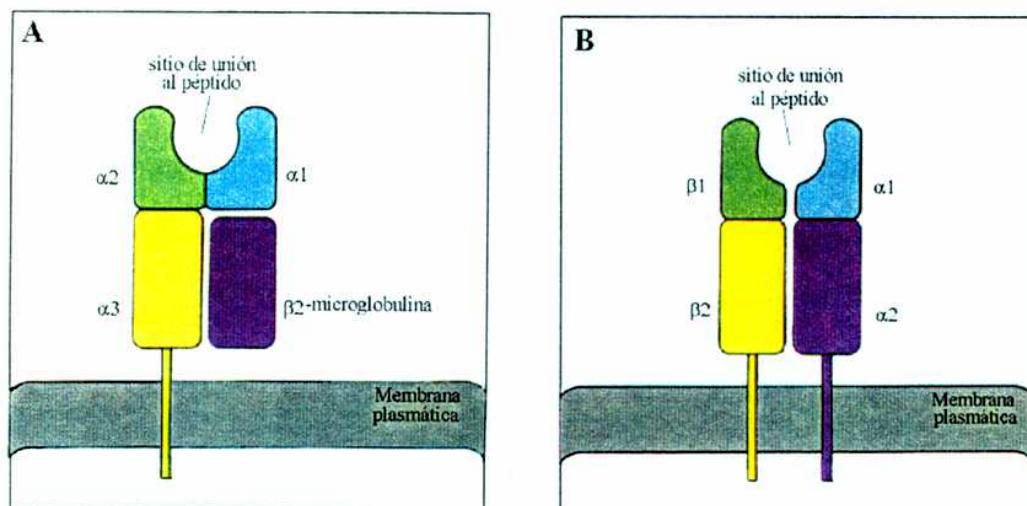


Figura 1: Se muestra esquemáticamente la estructura de las moléculas de histocompatibilidad. A) Molécula de clase I. Los dominios α_1 y α_2 de la cadena pesada forman el sitio de unión al péptido, el dominio α_3 junto con la cadena β_2 -microglobulina, se encuentran más cercanos a la membrana de la célula. Sólo la cadena α atraviesa la membrana. B) Molécula de clase II. El sitio donde el péptido se acomoda lo constituyen los dominios más externos α_1 y β_1 , correspondientes a la cadena α y β respectivamente. Los dominios más internos son los correspondientes a α_2 para la cadena α y β_2 para la cadena β . Ambas cadenas atraviesan la membrana. Se puede observar la similitud estructural entre ambas moléculas.

En el hombre existen tres moléculas de histocompatibilidad de clase I distintas, HLA-A, HLA-B y HLA-C (también denominadas moléculas de clase I clásicas), que cumplen la función de presentación de péptidos a los linfocitos T CD8. Las tres se expresan simultáneamente en la superficie de casi todas las células, con excepción de los glóbulos rojos y el sincicio trofoblasto. Para cada una de estas moléculas la cadena α está codificada dentro del complejo mayor de histocompatibilidad por un gen diferente (el A para HLA-A, el

B para HLA-B y el C para HLA-C), pero todas comparten la misma cadena β 2-microglobulina. La expresión de estas moléculas en la superficie de las células es codominante, es decir, se expresan simultáneamente las moléculas codificadas por el cromosoma materno y paterno. El elevado polimorfismo determina que la mayoría de los individuos sean heterocigotas y exhiban en la superficie celular seis productos de clase I diferentes: dos moléculas HLA-A, dos HLA-B y dos HLA-C.

Existen varias moléculas de clase II diferentes, que se expresan simultáneamente en la superficie celular, y su función es presentar péptidos antigenicos a los linfocitos T CD4. Pero éstas, a diferencia de las de clase I, poseen una distribución tisular muy restringida, expresándose constitutivamente en 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, queratinocitos, melanocitos, astrocitos y fibroblastos [2]. 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 discute más adelante). Aquí también los productos maternos y paternos se expresan codominantemente, por lo que, junto al polimorfismo del sistema, la mayoría de los individuos exhiben al menos seis productos de clase II distintos.

Se ha determinado la estructura cristalográfica de los alelos de clase I HLA-A2, HLA-Aw68 y HLA-27 humanos [3, 4, 5] y varios alelos murinos. Los dominios α 1 y α 2 se combinan para ensamblar una estructura de tipo fosa acanalada, localizada en la porción más externa de la molécula, y que constituye el sitio de unión a péptidos. La base de la fosa está conformada por ocho láminas β antiparalelas, cuatro aportadas por cada dominio; mientras que cada pared de la misma está definida por una estructura de α -hélice, una perteneciente al dominio α 1 y otra al α 2. Toda esta estructura está apoyada sobre los dominios más conservados α 3 y β 2-microglobulina (**Fig. 2**).

La principal diferencia entre las estructuras de HLA-Aw68 y HLA-A2 reside en 13

aminoácidos, 10 de los cuales se encuentran en la fosa de unión al péptido. La comparación entre estas moléculas demuestra cómo el polimorfismo altera el sitio de pegado del péptido y sugiere la base estructural de la especificidad alélica en la unión de péptidos antigenicos.

También fue establecida por cristalografía de rayos-X la estructura tridimensional de la molécula de clase II HLA-DR1 [6]. Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ (de las cadenas α y β respectivamente), adoptan en el espacio una estructura con una fosa similar a la presente en las moléculas de clase I.

Sin embargo, existen diferencias entre estas regiones en los dos tipos de moléculas presentadoras de antigenos que explican la razón por la cual, al estudiar los péptidos eluídos de moléculas de clase I y clase II purificadas, se encontró que para las primeras los péptidos son cortos, predominantemente de nueve aminoácidos [7, 8], mientras que para las segundas, los péptidos presentados varían en su longitud desde 15 a 24 aminoácidos [9]. 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 hallan los extremos más abiertos de manera que el péptido puede extenderse 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 antigenica, los cuales no se encuentran en las moléculas de clase II.

El sitio de unión a péptidos de las moléculas de histocompatibilidad presenta una serie de bolsillos, que interactúan con las cadenas laterales de ciertos aminoácidos del péptido unido (residuos de anclaje). Las moléculas de clase I tienen seis bolsillos (llamados A, B, C, D, E y F). Los bolsillos A y F, que definen los extremos del sitio de unión, están estructurados por residuos bastante conservados; esto determina que los extremos amino y carboxi terminales de los péptidos se asocien siempre con A y F respectivamente, y la orientación de los péptidos sea siempre la misma. 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 cada alelo. Los péptidos que se unen a cada variante alélica poseen patrones o motivos estructurales conservados, entre ellos pueden destacarse los residuos de anclaje correspondientes a la posición 2 y al carboxi-terminal, que ocupan los bolsillos B y F respectivamente.

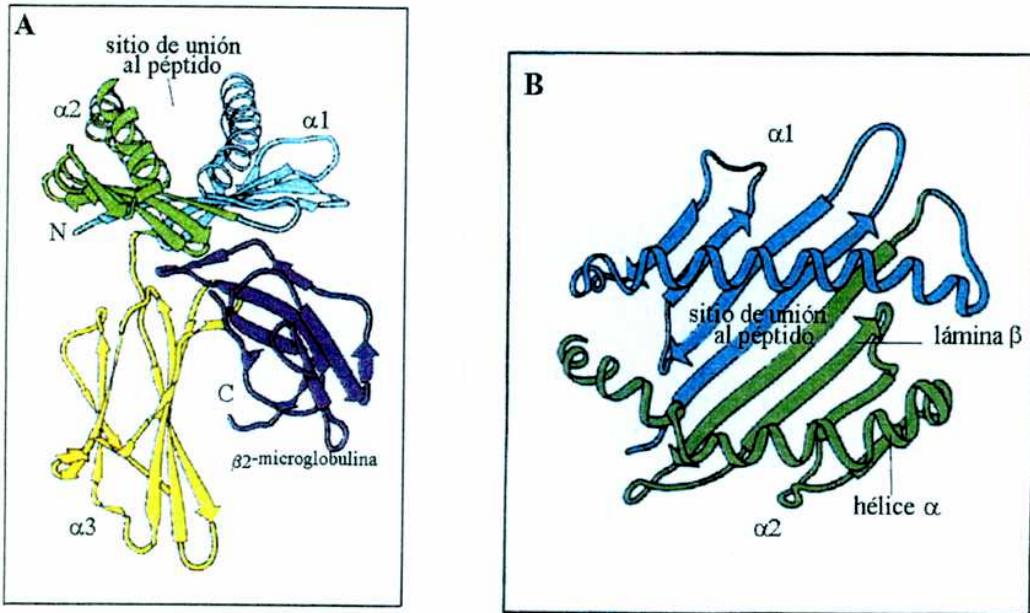


Figura 2: Estructura de una molécula de clase I, determinada por cristalografía de rayos-X. A) Diagrama de cintas de esta estructura. Se indica el sitio de unión al péptido y los dominios correspondientes a la cadena α y β_2 -microglobulina. B) Sitio de presentación antigénica mirando la molécula desde arriba, tal como sería vista por el receptor T. Se puede ver que los bordes de la fosa de presentación están formados por estructuras α -hélice, una de cada dominio (α_1 y α_2), y el piso por 8 láminas β , 4 correspondientes a cada uno de los mismos. Las moléculas de clase II poseen una estructura similar. Sin embargo, en estas moléculas los dominios que forman el sitio de presentación antigénica son aportados por diferentes cadenas y no están unidos por un enlace covalente. Además, en las moléculas de clase II, la fosa de presentación se encuentra más abierta en ambos extremos.

Así, en las moléculas de clase I, el péptido está anclado por sus extremos y su parte central protruye hacia el exterior interactuando con el receptor de célula T (TCR). En las moléculas de clase II se ha descripto la existencia de cinco bolsillos polimórficos, donde también existen interacciones con el péptido a nivel de algunas cadenas laterales. Los péptidos poseen menores restricciones estructurales comparados con los de clase I, además, se han descripto péptidos "promiscuos" que, independientemente de su estructura, pueden unirse a varios alelos de clase II distintos.

También se ha visto para las moléculas de clase I, que un mismo péptido puede ser unido por diferentes alelos, los cuales presentan los bolsillos B y F conservados [10, 11]. Por otra parte, un alelo HLA dado tendrá la capacidad de unir péptidos distintos que, por supuesto, cumplan con las restricciones pertinentes para ese alelo. Todo esto sumado al enorme polimorfismo

poblacional que presentan las moléculas presentadoras de antígeno, determina que el sistema en su conjunto pueda unir y presentar un amplio repertorio de péptidos diferentes. Así, este sistema tan complicado permite a nivel individual, que algún antígeno de un determinado patógeno pueda, casi siempre, ser presentado por alguna de las molécula de histocompatibilidad, asegurándose una respuesta inmune adecuada que proteja al individuo. Por otra parte, a nivel poblacional, la introducción o aparición de variantes nuevas de patógenos podrá ser combatida, ya que seguramente existirá en la población la variante alélica capaz de presentar algún péptido antigénico del patógeno.

La función biológica de las moléculas de histocompatibilidad, como se mencionó anteriormente, es presentar péptidos antigenicos 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 CD4 de los linfocitos T helper o CD8 de los linfocitos T citotóxicos, también están involucradas en el reconocimiento antigenico interactuando con los dominios más conservados de las moléculas de histocompatibilidad de clase II y clase I 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.

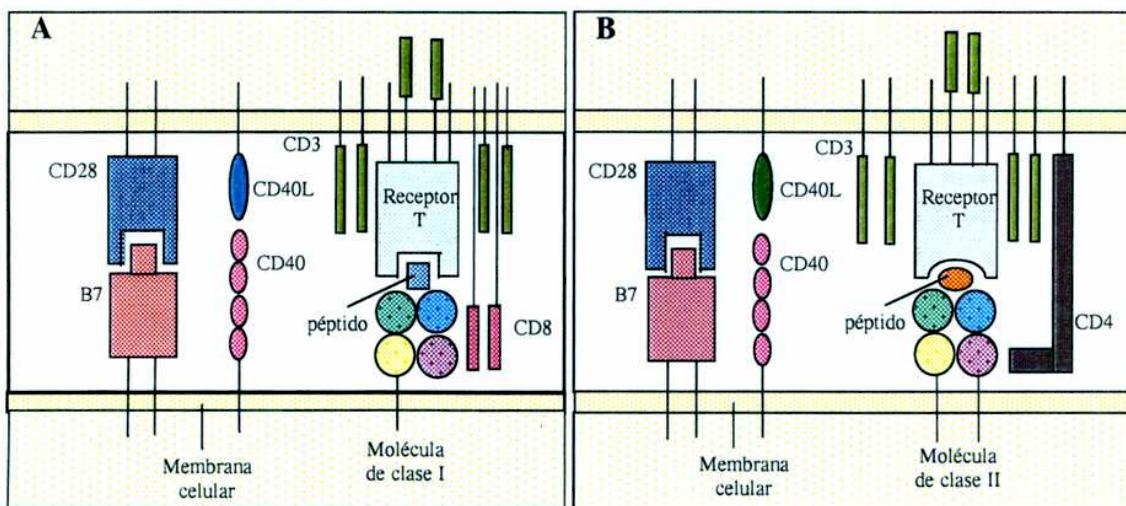


Figura 3: Interacción entre el receptor T y el complejo péptido-molécula de histocompatibilidad de clase II (A) o de clase I (B). Las moléculas accesorias CD4 del linfocito T helper y CD8 del linfocito T citotóxico interactúan con los dominios más conservados de las moléculas de clase II y clase I respectivamente. 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 del sistema HLA

El sistema HLA está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y su longitud estimada es de 4 millones de pares de bases (4000 kb). Este sistema ha sido dividido en tres regiones: la de clase I, la de clase II y la de clase III [12] (**Fig. 4**).

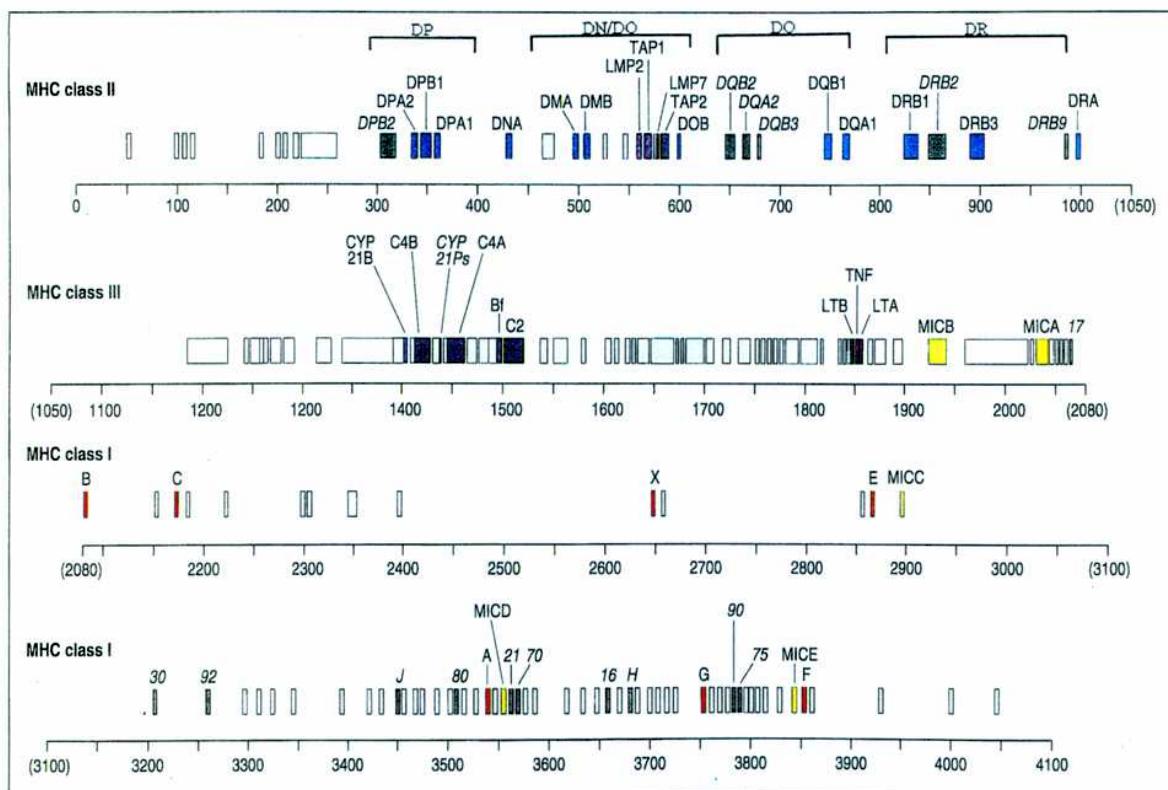


Figura 4: Mapa detallado de la región MHC humana. Se muestra la organización de las regiones de clase I, II y III, con las distancias genéticas aproximadas en miles de pares de bases (kb). La mayoría de los genes se mencionan en el texto. Los genes 17, 30, 92, 80, 21, 70, 16, 90, 75 poseen secuencias similares a los genes de clase I, pero son pseudogenes. La función de muchos genes de esta región del genoma se desconoce.

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 ésta región del cromosoma seis que se heredan en bloque de cada progenitor.

La región de clase I se encuentra ubicada hacia el extremo telomérico del sistema HLA, está distribuida 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 homóloga entre sí, para muchos de los cuales se desconoce la función biológica.

En esta región se encuentran los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C, que codifican para la cadena pesada (α) de las moléculas de clase I "clásicas" con función de presentación antigenética. Otros genes de clase I, los denominados genes de clase IB (HLA-E, -J, -H, -G y -F), han sido caracterizados. El número exacto de los mismos varía ampliamente entre especies y aún entre miembros de la misma especie. Los genes de clase IB codifican para la cadena pesada de las moléculas de clase I "no clásicas".

Su expresión en las células es variable, no sólo en los niveles expresados en la superficie sino también en la distribución en los tejidos. 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-J y HLA-H constituyen algunos de los pseudogenes de la región de clase I. La expresión de HLA-G está restringida a la placenta, y se sospecha que juega un rol importante en los fenómenos inmunes de la gestación [13]. HLA-F se expresa en bajos niveles en linfocitos T, B, hígado, timo fetal y piel. Algunos genes de clase IB tienen un control regulatorio diferente del clásico encontrado en los genes de clase I, y son inducidos en respuesta a estrés (como un shock térmico). Estos genes podrían participar en la inmunidad innata, o en la inducción de respuestas inmunes en circunstancias en las que no sean producidos los interferones.

Otros genes de clase IB podrían funcionar inhibiendo la muerte celular producida por las células NK, un rol que llevan a cabo varias moléculas de clase I clásicas. Este rol fue sugerido para la molécula HLA-G, la cual, como se mencionó antes, es expresada en células de la placenta. Estas células sólo expresan moléculas de clase I no clásicas y no pueden ser reconocidas por células T CD8 pero, a diferencia de otras células que carecen de moléculas de clase I clásicas, no son matadas por células NK. La combinación de la pérdida de moléculas de clase I clásicas y la expresión de HLA-G podrían proteger al feto del ataque por células T CD8 o por NK [14].

Organización de un gen de clase I: Un gen de clase I está constituido por siete exones, que se corresponden con los dominios proteicos de la cadena pesada: el exón 1 codifica para el péptido señal (leader), los exones 2, 3 y 4 codifican para los tres dominios externos α_1 , α_2 y α_3 , el quinto exón para el dominio transmembrana y los exones 6 y 7 para la porción intracitoplasmática. Su longitud aproximada es de 4 kb (**Fig. 5**).

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 péptido de cadena invariante asociado a clase II (CLIP) y el cargado del péptido de la vía exógena, ambos fenómenos mediados por la molécula HLA-DM [15] (ver sección de procesamiento y presentación antigenética). En la región DQ se encuentran los pseudogenes DQA2, DQB2 y DQB3 y los genes DQA1 y DQB1, que codifican para la molécula HLA-DQ. En la región DR la situación es un poco más complicada. Si bien hay un solo gen que codifica para la cadena α , el gen DRA1, existe más de un gen DRB. El gen DRB1 se encuentra presente en todos los 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) [16].

Organización de los genes de clase II: Los genes para la cadena β están constituidos por cinco exones, 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 para el segmento transmembrana y parte del intracitoplasmático, y el exón 5 para el resto de este segmento y la región 3' no traducida. Los genes de cadena α poseen cuatro exones, el primer exón codifica el péptido señal y cuatro residuos del primer dominio; el exón 2 codifica el resto del dominio $\alpha 1$ y el tercer

exón el dominio $\alpha 2$; el exón cuatro codifica los segmentos transmembrana e intracitoplasmático. Los genes poseen una longitud aproximada de 8 kb (**Fig. 5**).

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 antigenica, muchos de ellos desempeñan funciones inmunes. Así, encontramos los genes que codifican para las citoquinas TNF α (factor de necrosis tumoral) 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 CYP21 B, que codifica para la 21-hidroxilasa, enzima que interviene en la biosíntesis de esteroides en la corteza adrenal.

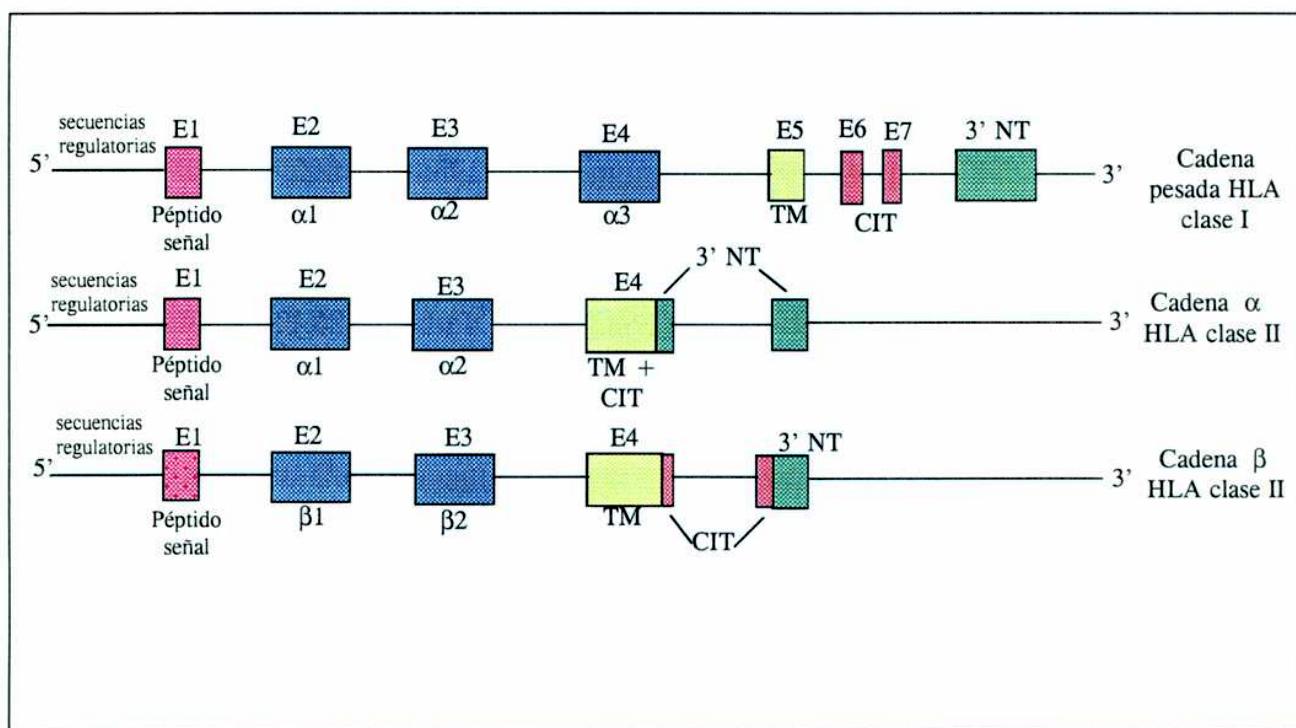


Figura 5: Organización estructural de los genes de clase I (cadena pesada) y de clase II (cadena α y cadena β). El tamaño de los exones (E1, E2, etc.) e intrones no está en escala. Debajo de cada exón se determina a qué dominio en la molécula corresponde. TM: transmembrana; CIT: intracitoplasmático; 3'NT: región 3' no traducida.

Una de las principales características de las moléculas presentadoras de antígeno es su elevado polimorfismo, es decir, la existencia de múltiples variantes alélicas para cada locus.

La magnitud de dicho polimorfismo se determina por diferentes métodos de tipificación (los cuales se discuten más adelante); de esta manera se han descripto hasta el momento 106 alelos para el locus A, 240 para el B y más de 45 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 [17, 18, 19]. De esta manera, un individuo portará en sus células (por ej.: monocitos) las tres moléculas de clase I y las tres de clase II simultáneamente, pero a su vez, cada una de ellas podrá expresar dos alelos distintos (uno heredado por el 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).

2.3- Procesamiento y presentación antigénica

Se conoce la existencia de dos grandes vías de procesamiento y presentación antigénica: la vía endógena involucrada en la presentación de moléculas presentes en el citosol celular y la vía exógena en la presentación de moléculas extracelulares y moléculas asociadas a la membrana de la célula. Mientras que la primera genera péptidos que son presentados por moléculas de histocompatibilidad de clase I para estimular células T CD8, la segunda presenta péptidos por moléculas de clase II a linfocitos T CD4.

2.3.1- Vía exógena o endocítica

Las moléculas de clase II principalmente unen péptidos que provienen de proteínas endocitadas que son procesadas en los endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas por proteasas como la catepsina B y D [20].

Hay fuertes evidencias que sostienen que la unión de péptidos por moléculas de clase II ocurre principalmente en un compartimento pre-lisosomal (el denominado compartimiento de carga de clase II), donde las moléculas de clase II recientemente sintetizadas se acumulan (**Fig. 6**) [21]. Las cadenas α y β de las moléculas de clase II se ensamblan en el retículo endoplasmático por medio de la calnexina y se asocian inmediatamente con un polipéptido trimérico, llamado cadena invariante, que actúa como chaperona en el plegamiento de la molécula de clase II y previene la ocupación del sitio de unión al péptido de la misma. La mayor parte de la cadena invariante es removida por proteólisis antes de la llegada de la molécula al 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 carga de clase II y catalizan la remoción dependiente del pH del CLIP. El mismo mantiene a las moléculas de clase II en una conformación inestable para la recepción de péptidos. La remoción del CLIP permite la unión de otros péptidos generados en la vía endocítica, lo cual induce que las moléculas de clase II adopten una conformación altamente estable. Una vez cargada con el péptido, la molécula de clase II es transportada a la membrana de la célula.

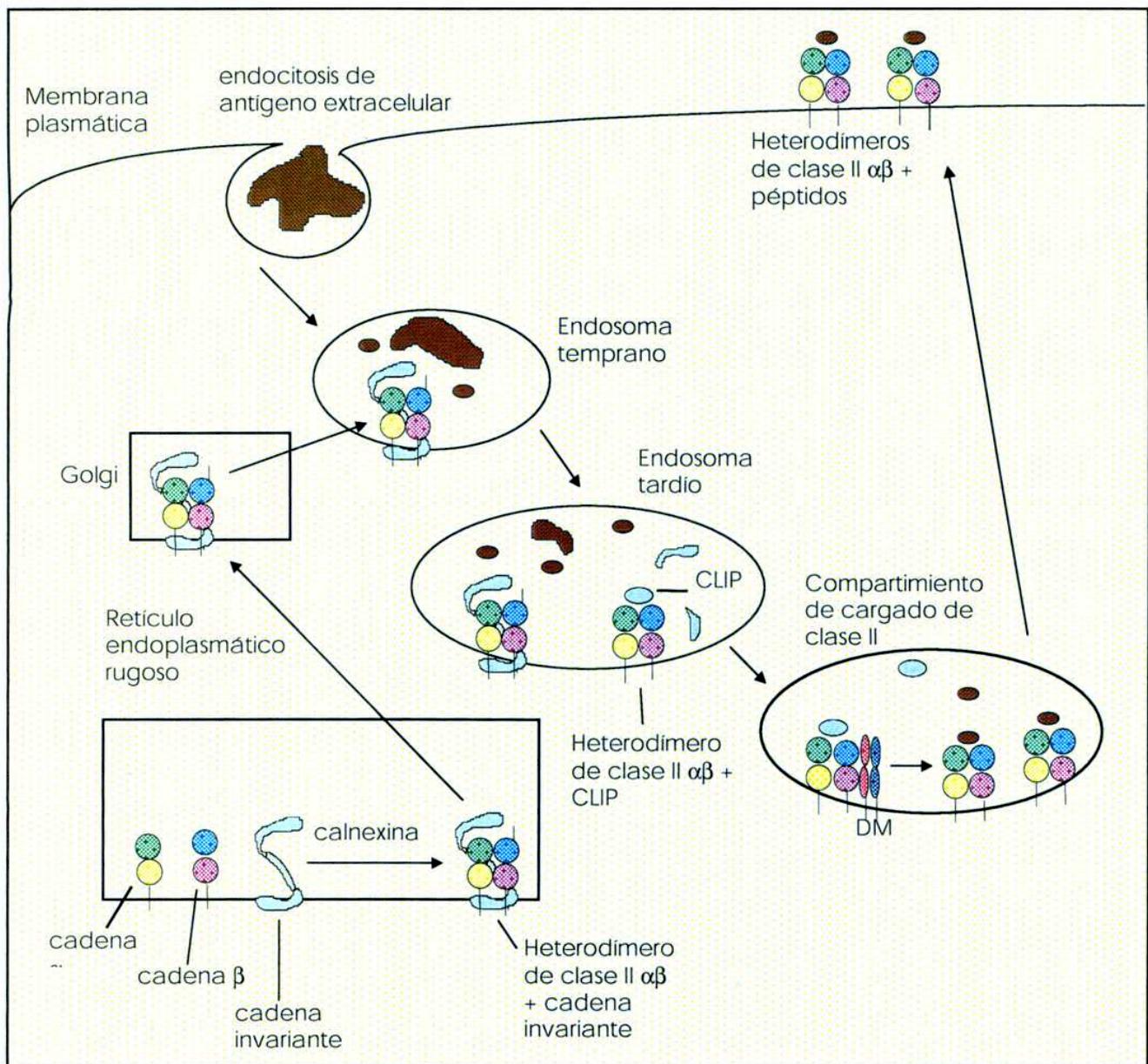


Figura 6: Vías de ensamblaje, unión del péptido y expresión en la superficie celular de las moléculas de histocompatibilidad de clase II. Ver texto para discusión.

2.3.2- Vía endógena o biosintética

Los péptidos unidos por las moléculas de clase I provienen de proteínas citosólicas procesadas en una vía proteolítica mediada por proteasomas. Los mismos son complejos proteicos multicatalíticos, que constan de 15 a 20 subunidades, entre las que se encuentran los productos de los genes Lmp2 y Lmp7 [22].

Los péptidos generados por proteasomas son transportados al retículo endoplasmático por proteínas transportadoras denominadas TAP (**Fig 7**). El transportador TAP es un heterodímero formado por los productos de los genes TAP1 y TAP2, cada uno tiene un dominio citosólico de unión a ATP y un dominio con siete segmentos transmembrana. El transporte de péptidos por TAP es dependiente de ATP. Por otra parte, la cadena α de la molécula de clase I, recién sintetizada en el retículo endoplasmático, se asocia con la subunidad β 2-microglobulina en este mismo lugar. Esta unión tiene como chaperona a la calnexina, que se mantiene unida hasta que el complejo heterodimérico es formado. El heterodímero cadena α - β 2-microglobulina se asocia con el transportador TAP. Esta asociación es requerida para el cargado del péptido, lo cual permite el correcto plegamiento y la estabilidad de la molécula de clase I. Luego el transportador TAP le transfiere el péptido con la intervención de otra chaperona. Las moléculas correctamente plegadas y cargadas con el péptido son exportadas a la membrana de la célula. Los heterodímeros que no se asocian inmediatamente con TAP o son cargados con un péptido inapropiado, no son exportados al Golgi y son degradados o reciclados para ser nuevamente cargados con péptidos.

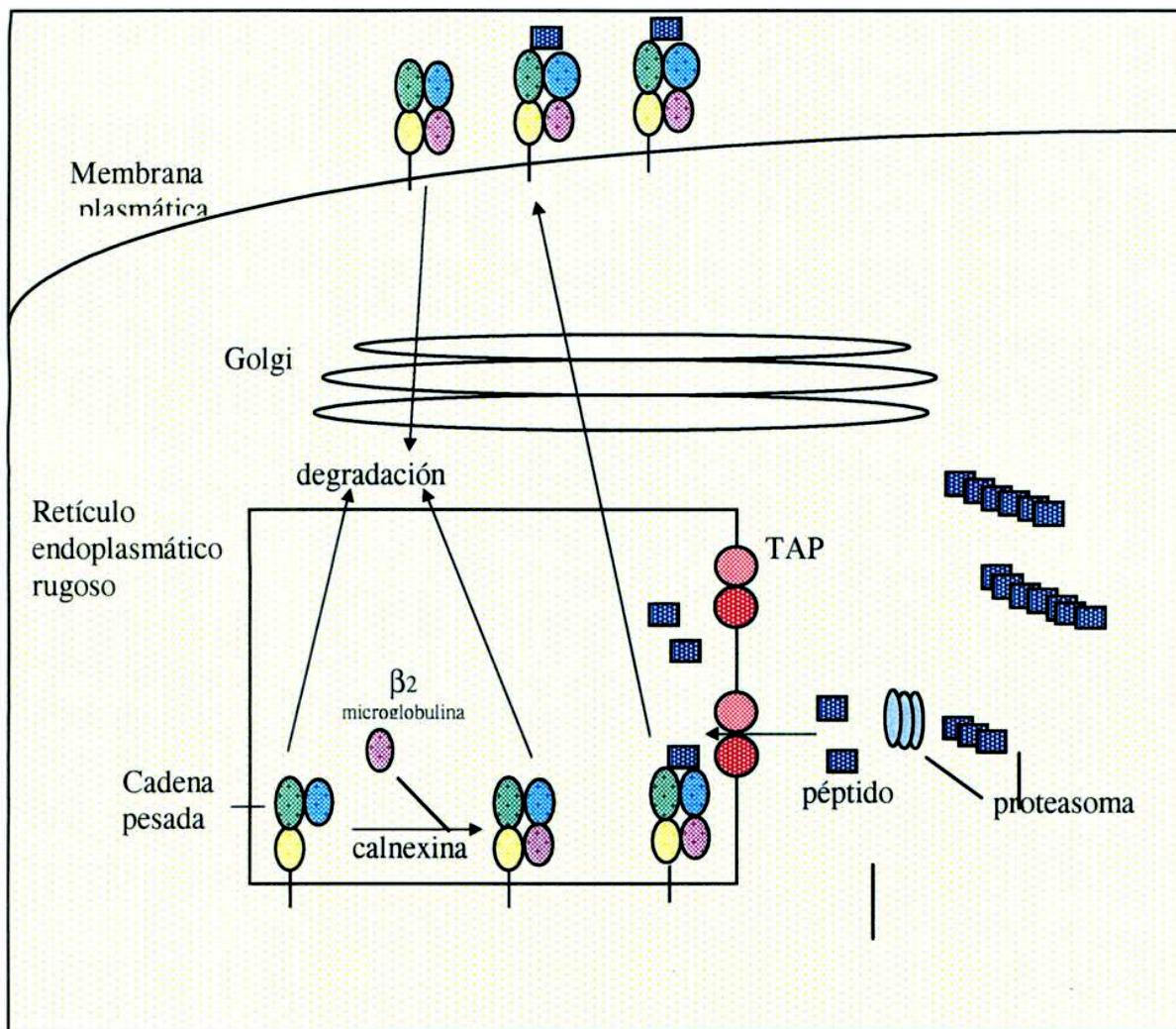


Figura 7: Vías de ensamblaje, unión del péptido y expresión en la superficie celular de las moléculas de histocompatibilidad de clase I. Ver texto para discusión.

2.4- Evolución del MHC de clase I

En este sección se tratará lo concerniente a la generación y al mantenimiento del polimorfismo, centrándose en los loci de clase I, aunque también se hará referencia a algunos aspectos de los loci de clase II a modo comparativo.

2.4.1- Generación del polimorfismo

El estudio de los mecanismos que generan el polimorfismo en el MHC fue centrado en dos modelos de especiación. El primero se encuadra en el paradigma de que las nuevas especies son formadas a partir de pequeñas poblaciones de especies existentes. Gran parte del polimorfismo preexistente es perdido en las nuevas especies, las cuales desarrollan su polimorfismo nuevamente. El segundo modelo considera que grandes poblaciones de especies existentes dan origen a nuevas especies. Éstas pueden heredar el polimorfismo ya establecido de una manera denominada trans-especie (o trans-específica) [23].

Para dilucidar cual era el modelo válido, se realizaron comparaciones entre primates superiores. Fueron encontrados alelos similares del MHC en diferentes especies de primates superiores y representaron linajes alélicos (grupos de alelos con homología entre distintas especies) que existieron en el antecesor común y persistieron por largos períodos de tiempo (45 millones de años), siendo heredados a través de sucesivos eventos de especiación [24]. Ciertos linajes son compartidos por los humanos y los monos del viejo mundo, pero no se observaron en los monos del nuevo mundo. Sin embargo, en ningún caso fueron encontrados alelos idénticos entre dos especies, mostrando que los alelos sufren modificaciones constantemente durante su evolución. Los datos mostraron concordancia con el segundo modelo (hipótesis de transespecie), en el cual el polimorfismo es derivado de especies ancestrales y no generado en cada especie independientemente, y ciertos 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 construidos 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.

El polimorfismo del MHC parece estar seleccionado por presiones evolutivas. Sin embargo, para que la selección pueda actuar eficientemente en organismos que se reproducen lentamente como los humanos, también debe haber otros mecanismos que generen variabilidad en los alelos del MHC sobre los cuales la selección pueda ejercer su efecto.

Existen varios mecanismos genéticos que contribuyen a generar nueva diversidad en el MHC. Algunos alelos nuevos son el resultado de mutaciones puntuales, pero la recombinación genética y la conversión génica parecen ser de mayor importancia en el origen del polimorfismo alélico [25].

Conversión génica

En este mecanismo molecular, el cual puede ocurrir entre alelos de un mismo locus (conversión interalélica) o menos frecuentemente entre alelos de diferentes loci HLA (conversión intergénica) (Fig. 8), una secuencia corta es remplazada por otra de un gen homólogo. Debido a este proceso, es muy característico observar que los alelos de clase I comparten cortas secuencias ("motifs"), que corresponden a las regiones hipervariables, en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena pesada.

La magnitud del mecanismo de conversión en el polimorfismo MHC varía para cada locus y es significativo en HLA-B.

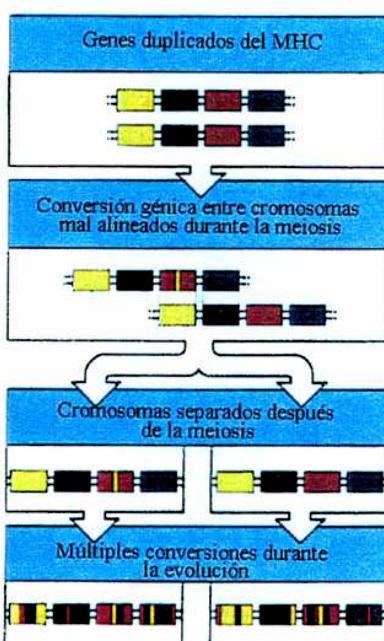


Figura 8: Esquema del mecanismo de conversión génica. En particular se muestra el caso de la conversión intergénica.

Recombinación genética

Existen dos tipos de recombinación involucrados en la generación del polimorfismo: la intragénica o interalélica, 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 de la homología 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 aclara primero, que el hecho de compartir secuencias no se debe a la acumulación de mutaciones paralelas en diferentes linajes alélicos (convergencia) [26]. Si bien se ha demostrado que el mecanismo de recombinación intergénica puede haber jugado algún papel en la evolución de las moléculas de histocompatibilidad [27], 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 [28].

2.4.2- Mantenimiento del polimorfismo

Desde la identificación de las moléculas de histocompatibilidad como "antígenos de transplante", los mecanismos evolutivos que mantienen el polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se encuentran en pleno debate. Fueron consideradas como potenciales explicaciones del polimorfismo del MHC, la teoría neutral, la cual considera que la mayoría de cambios evolutivos a nivel molecular son causados por mutaciones neutras que no tienen efecto en la capacidad adaptativa, y la de selección natural.

La primera teoría es generalmente aplicada a porciones transcripcionalmente inactivas (pseudogenes), en las cuales se acumulan con el tiempo sustituciones sinónimas (dS) (es decir, que el aminoácido codificado después de la mutación no varía, también llamadas silenciosas), mientras que la segunda es aplicada a regiones del genoma con sustituciones no sinónimas (dN) (la mutación hace que se codifique para un nuevo aminoácido).

El testeo de estas hipótesis requería del conocimiento de las secuencias nucleotídicas de los alelos del MHC, las cuales se encontraron disponibles recién en los '80. Análisis de estas secuencias revelaron regiones en las cuales las sustituciones no-sinónimas era muy abundantes. Además la determinación de la estructura tridimensional de las moléculas de clase I y II permitió la caracterización de los sitios de reconocimiento antigenico (ARS). Al determinar el número de sustituciones sinónimas para los distintos loci de clase I se observó que para los ARS la relación dN/dS es mayor que uno en todos los casos analizados. Esto evidencia que sobre los 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.

Se encuentran diferencias entre los distintos loci de clase I en cuanto a la tasa dN/dS en los ARS. Los valores obtenidos en humanos para HLA-A, -B y -C, son 3.8, 4.7 y 1.9 respectivamente [29]. Por otro lado, la estimación de un coeficiente de selección permitió observar diferencias en la intensidad de selección operando en los distintos loci HLA. La selección sobre el locus HLA-B parece ser la más fuerte, seguida por los loci DRB1 y HLA-A, mientras que una selección débil estaría actuando en los loci DQB, DQA, C y DPB1. Estas diferencias en la intensidad de selección se correlacionan con el grado de polimorfismo entre los diferentes loci HLA y con la generación trans-específica del polimorfismo. Los loci HLA-B y DRB1 son los mas polimórficos y sus alelos pertenecen a linajes muy ancestrales. Por ejemplo, algunos linajes alélicos del locus DRB1 fueron encontrados en el antecesor común de prosimios y primates antropoides (el cual vivió hace 85 millones de años (m.a)). Estos linajes no hubiesen persistido tan largo período de tiempo sin selección. En el locus HLA-B, la comparación de los linajes alélicos con otros primates no resultan tan claras como para el locus DRB1. Sin embargo el gran número de dS acumuladas en los alelos HLA-B muestran que el tiempo de divergencia entre los mismos es de 15 a 30 m.a. Su persistencia también es consistente con una fuerte selección actuando sobre este locus.

Por lo comentado hasta el momento, puede notarse que los mecanismos selectivos son los

aceptados actualmente para explicar el mantenimiento del polimorfismo. Pero la pregunta 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 a un patógeno; entonces la selección debe ser ejercida por los patógenos. Otros agentes causantes del mantenimiento del polimorfismo del MHC han sido propuestos, como ser, interacciones materno-fetales o preferencias en el apareamiento [30]. Los argumentos más convincentes hablan a favor de los patógenos como agentes de la selección [31].

La importancia de los diferentes mecanismos de selección fue estudiada en modelos, simulaciones y análisis estadísticos. Se vio que dos de éstos mecanismos son aplicables al MHC, los cuales son: la ventaja del heterocigota (selección sobredominante) y la selección dependiente de la frecuencia. Ambos modelos focalizan en problemas inmunológicos que son, respectivamente, de naturaleza general o específica, y de duración larga o corta. 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 como una consecuencia de los mecanismos de escape de los patógenos al reconocimiento inmune dependiente del MHC [32]. Si bien las variantes del patógeno que logren escapar serán favorecidas, 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 presentar 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 genotipos 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. Un ejemplo del modelo dependiente de la frecuencia, lo constituye la incrementada frecuencia del alelo B*5301 en la población de Gambia (oeste de África), la

cual parece ser un resultado directo de la selección por el parásito de la malaria y la enfermedad que éste causa.

La selección equilibradora actuando sobre los loci HLA-A, HLA-B, DRB1, DQB1 y DQA1, es indicada por la prevalencia de sustituciones no sinónimas a sinónimas en el ARS y por el desequilibrio de ligamiento (ver sección de desequilibrio). Otro dato que confirma la selección equilibradora actuando sobre los alelos de estos loci surge del test de Ewens-Watterson donde las frecuencias génicas 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 (la cual tiende a eliminar las dN) está actuando el valor observado será mayor al esperado, mientras que si la que está actuando es la selección equilibradora se espera lo contrario. De esta forma, para los loci HLA-A, HLA-B, DRB1, DQB1 y DQA1, 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, mientras que para el locus HLA-C no ha sido realizado este estudio (**Fig. 9**) [31, 33].

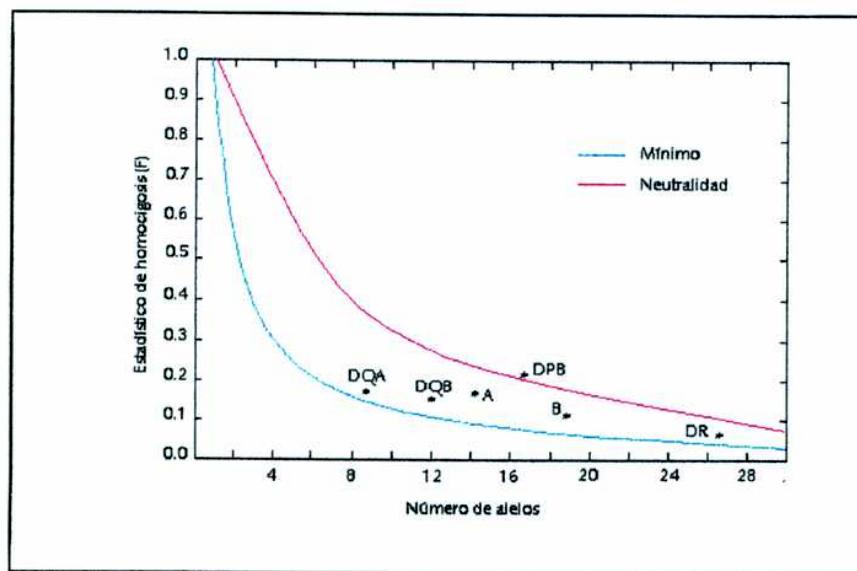


Figura 9: Estadístico de homocigosis versus Número de alelos de los distintos loci del sistema HLA (excepto HLA-C) para los valores esperados en condiciones de neutralidad y como si los alelos estuvieran presentes en frecuencias iguales ($\text{mínimo} = 1/\text{número de alelos}$). Se muestran las posiciones que ocupan los diversos loci [34].

Entre los loci de clase I, HLA-C ha sido el menos estudiado, teniéndose por tal motivo un gran desconocimiento de los mecanismos que permiten mantener su polimorfismo. Presenta menor relación dN/dS comparado con HLA-A y HLA-B, un bajo coeficiente de selección estimado y no se conoce su comportamiento respecto de lo esperado en condiciones de neutralidad selectiva.

2.5- HLA y genética poblacional

2.5.1- Haplótipos y desequilibrio de ligamiento

Los haplotipos (combinación de alelos de diferentes loci en el mismo cromosoma) han sido estudiados en una gran variedad de poblaciones y estos presentan numerosas combinaciones alélicas que incluyen a los loci de clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C, y a los de clase II, HLA-DRB, DQA y DQB. Los diversos haplotipos reportados son del tipo: HLA-A-HLA-B; HLA-A-HLA-C-HLA-B; HLA-A-HLA-B-DRB1; DRB1-DQA1-DQB1; DRB1-DQA1-DQB1-DPB1, entre otros. Sin embargo nunca se han analizado haplotipos involucrando a los loci de clase II con HLA-C y esto se debe en parte a que la tipificación de este último locus por técnicas de biología molecular comenzó a realizarse hace relativamente poco tiempo (1994) [35, 36], como así también a las dificultades metodológicas para su estudio por serología. En las tablas 1 y 2 se muestran los haplotipos DRB1-DQA1-DPB1 más comunes en las poblaciones caucásicas y amerindias [37, 38]. Aunque estas combinaciones alélicas no contienen al locus HLA-C, serán de gran utilidad al analizar los resultados.

DRB1-DQA1-DQB1
0101-0101-0501
1501-0102-0602
0301-0501-0201
0401-0301-0301
0404-0301-0302
1302-0102-0604
0701-0201-0604
0701-0201-0201
1101-0501-0301

Tabla 1: Haplótipos DRB1-DQA1-DQB1 más comunes encontrados en poblaciones caucásicas. Todas las combinaciones mostradas presentan desequilibrio de ligamiento significativo.

DRB1-DQA1-DQB1	Poblaciones
1602-0501-0301	Todas las poblaciones excepto la Seri
0403-03011-0302	Chiriguanos, Wayuu , Yukpa , Zapoteco, Mixteco, Mixe
0404-03011-0302	Chiriguanos, Kaingang , Wayuu, Seri, Zapoteco, Mixteco
0407-03011-0302	Chiriguanos, Wayuu , Yukpa, Seri , Zapoteco, Mixteco , Mixe
0411-03011-0302	Chiriguanos, Guaraní , Kaingang, Wayuu , Yukpa
1402-0501-0301	Chiriguanos , Yukpa, Seri, Zapoteco, Mixteco, Mixe
1406-0501-0301	Chiriguanos , Zapoteco, Mixteco, Mixe
1413-0501-0301	Guaraní
0802-0401-0402	Todas las poblaciones ($f < 0.1$ en la Wayuu)
0901-03-0303	Guaraní, Kaingang, Chiriguanos

Tabla 2: Haplótipos DRB1-DQA1-DQB1 más comunes encontrados en poblaciones amerindias (de México: Seri, Zapoteco, Mixteco y Mixe; de Brasil: Guaraní y Kaingang; de Venezuela: Yukpa; de Colombia: Wayuu y de Argentina: Chiriguanos). En negrita se muestran las poblaciones que presentan una frecuencia mayor al 10% del haplotípico.

Un aspecto interesante del sistema 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 con frecuencias que difieren de 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. Numerosos haplotipos con desequilibrio de ligamiento significativo han sido documentados en poblaciones caucásicas (**Tabla 1**).

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 que separa 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 otro lado se han observado haplotipos HLA-B-DRB1 con fuertes desequilibrios de ligamiento. Sin embargo la distancia de recombinación entre estos loci es bastante elevada, siendo incluso mayor a la que separa DRB1 de DPB1, entre los cuales el desequilibrio de ligamiento parece ser débil. Además, la distancia que separa al locus HLA-B de DRB1 es incluso mayor a la que separa DRB1 de DPB1 (aproximadamente 1250kb en el primer caso y 400kb en el segundo) [34]. Para explicar este hecho se ha propuesto que la recombinación entre HLA-B y DRB1 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 DRB1 y DPB1 [39, 40].

No se ha estudiado el desequilibrio entre HLA-C y los loci de clase II, sin embargo en varias poblaciones han sido observadas asociaciones positivas entre los loci de clase I y entre éstos (excepto HLA-C) y los de clase II. A modo de ejemplo pueden citarse: el fuerte desequilibrio entre HLA-C y HLA-B en poblaciones caucásicas [37, 41] y entre HLA-B y HLA-DRB1 en dos poblaciones amerindias (Wichi y Toba) [33].

2.5.2- Frecuencia de los alelos del locus HLA-C en distintas poblaciones

En las poblaciones de individuos Caucásicos estudiadas los alelos predominantes son el Cw*0701 y Cw*0702, seguidos por el Cw*0401. Por el contrario, en los asiáticos el alelo predominante es el Cw*0304, seguido por el Cw*0701 y Cw*0702 y también suelen estar en frecuencias altas (dependiendo de las poblaciones) el Cw*0102 y el Cw*0401. En las poblaciones africanas predominan los alelos Cw*0701 y Cw*0702, seguidos por el Cw*0601, pero en algunas poblaciones (por ej: Bubi de Guinea Ecuatorial y Sudáfrica) el alelo Cw*1701 también presenta frecuencias altas [42, 43, 44].

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, tanto de clase I como de clase II , que derivarían de los fundadores por mutaciones puntuales o conversión génica [24].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 [45]. Algunas de las posibles causas de la escasa diversidad HLA encontrada en las tribus indígenas de América podrían derivar de la presencia de pocos alelos fundadores combinado con endogamia, de la pérdida de la población por enfermedad o condiciones climáticas adversas (cuello de botella) o de la acción de la deriva génica en poblaciones pequeñas y aisladas.

Existen muy pocos estudios realizados en poblaciones amerindias para el locus HLA-C, pero pueden comentarse algunas tendencias. Las poblaciones analizadas son de Brasil, Colombia y Norteamérica, las mismas revelan la ya discutida reducción de alelos y la presencia, como alelo predominante del Cw*03041 o Cw*0401 dependiendo de la población, encontrándose luego, en frecuencias significativas alelos que son raros en las poblaciones Caucásicas, como ser el Cw*0303, el Cw*0803 y el Cw*1503, entre otros [24, 38, 46].

2.6- HLA y respuesta alogeneica

Para comprender la naturaleza de ciertos métodos de tipificación es necesario primero conocer la respuesta alogeneica. 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 (que poseen alelos HLA diferentes). Los linfocitos T, durante su ontogenia "aprenden" a diferenciar lo propio de lo extraño. 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, o la destrucción de las células extrañas. 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 dador (para evitar su proliferación) se enfrentan con linfocitos T CD4 del receptor 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 caracterización de las variantes antigénicas o alélicas que porta un individuo. La misma puede ser utilizada para determinar la compatibilidad previo a un trasplante, estudiar asociaciones entre HLA y enfermedades, estudios étnicos y estudios de filiación. A continuación se describen diversos métodos utilizados para llevar a cabo la tipificación.

Serología

En este método se utilizan antisueros obtenidos a partir de sangre o placenta de mujeres multiparas o de individuos politransfundidos o anticuerpos monoclonales, cuya especificidad HLA se conoce y que reconocen una variante antigénica para un determinado locus. Se colocan antisueros contra las distintas especificidades en los micropozos de una placa de

tipificación y se siembran células mononucleares del individuo a tipificar en cada uno de los micropozos. Después de una incubación, se agrega complemento. Por último se adiciona un colorante de exclusión vital. Cuando el antisero 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 es utilizado para las moléculas de clase I y para los loci de clase II HLA-DR y DQ.

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.

En las técnicas serológicas y CML se tipifica a las moléculas de histocompatibilidad en su forma nativa y sobre la superficie de la célula.

En lo que respecta al locus HLA-C se encuentran grandes dificultades metodológicas para su tipificación por serología. Entre un 20 y 40% de los alelos de este locus no son detectados por este método en la mayoría de las poblaciones estudiadas [47, 48], y se los denomina alelos "blanco". Esto se debe básicamente a una combinación de tres factores: 1) los productos HLA-C se expresan en mucha menor densidad superficial comparado con HLA-A y HLA-B, 2) existen escasos reactivos serológicos que reaccionen con determinantes polimórficos de este locus y 3) falta de información acerca de la distribución de los alelos "blanco" HLA-C [41, 49].

Con el desarrollo de técnicas de biología molecular, en las cuales el análisis se efectúa a nivel del ADN, se pudo determinar que el polimorfismo para las moléculas de histocompatibilidad es mucho mayor al encontrado por serología o por CML. Por técnicas serológicas sólo pueden identificarse 10 especificidades HLA-C (Cw1 al Cw10), mientras que el número de

polimorfismo definidos, no se 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.

PCR con *primers* específicos de secuencia (SSP)

En este caso, la muestra a tipificar se amplifica por PCR con varios pares de *primers*, donde cada par amplifica determinados 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 [51, 52].

PCR-polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP)

Una vez realizada la amplificación de la muestra, el producto de PCR se desnaturaliza y se corre en un gel de poliacrilamida. Luego, los fragmentos separados se visualizan mediante una tinción con plata. El método se basa en la separación de las hebras de ADN, las cuales según su secuencia, adoptarán en el espacio conformaciones diferentes. De este modo, cada alelo o combinación de los mismos poseerá un patrón electroforético característico que permitirá su identificación. Este método presenta como limitante que el fragmento de PCR debe tener un largo entre 200 y 500 pares de bases [53].

Secuenciación

Este método puede llevarse a cabo a través de varias estrategias, entre ellas se pueden destacar la secuenciación directa de productos de PCR de ADN genómico (PCR-secuenciación) y la amplificación por PCR, clonado y posterior secuenciación tanto de ADN genómico como de ADN complementario (cDNA) [53]. Para todas ellas, se utilizan equipos de secuenciación automática que permiten 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 correspondiente a cada nucleótido) llamado electroferograma [54]. La segunda estrategia mencionada presenta la ventaja de que el paso de clonado permite separar los alelos del locus a tipificar previo a la secuenciación, pero es técnicamente más complicada y requiere mayor tiempo que la PCR-secuenciación.

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 resultante para un individuo es igual a la "suma" de los patrones de cada alelo. Por esto 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. En consecuencia, el resultado de la tipificación en estos casos no permite discriminar cual de las dos combinaciones posibles de alelos es la correcta.

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

Análisis de conformación mediado por una cadena de referencia (RSCA)

Este método fue reportado recientemente para la tipificación de los loci de clase I y al igual que el de PCR-SSCP está basado en las diferencias conformacionales del ADN entre diferentes alelos HLA. Consiste en una amplificación de la muestra a tipificar con *primers* específicos para un locus (HLA-A, HLA-B o HLA-C). Por otro lado se construyen las cadenas de referencias, para lo cual se amplifican muestras homocigotas para los loci mencionados y se marcan fluorescentemente en una sola cadena. Luego el producto de PCR de la muestra se mezcla con el de la cadena de referencia (ambos productos deben pertenecer a un locus determinado), se realiza una desnaturización seguida de una renaturalización para que se formen todos los dúplex posibles y por último los mismos son separados en una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante. Los dúplex marcados fluorescentemente se visualizan usando un sistema de detección láser y la movilidad de los mismos se analiza usando un software. De este modo los loci heterocigotas presentaran dos señales fluorescentes correspondientes a los heterodúplex que forman cada uno de sus alelos sumado a la señal perteneciente al homodúplex que forma la cadena de referencia [55].

3. Objetivos

El primer objetivo de este trabajo es poner a punto una metodología molecular de tipificación del locus HLA-C por medio de la reacción en cadena de la polimerasa y el uso de oligonucleótidos específicos de secuencia: PCR-SSO.

Debido a que la complejidad alélica del locus HLA-C en las diversas poblaciones que habitan la República Argentina es absolutamente desconocida, el segundo objetivo es utilizar la técnica anteriormente mencionada para determinar la distribución y frecuencia de los alelos HLA-C en cuatro poblaciones argentinas diferentes: individuos caucásicos que habitan Buenos Aires y suburbios (con ancestros criollos, españoles e italianos), un grupo de indígenas Mapuches de una comunidad aislada de la Prov. de Neuquén, un grupo de Chiriguanos y otro de Mataco-Wichis de Orán, Salta.

El tercer objetivo es dilucidar aspectos sobre los mecanismos selectivos que actúan manteniendo el polimorfismo de este locus.

Como último objetivo se desea, mediante el estudio de frecuencias de los alelos HLA-C, investigar las relaciones filogenéticas entre varios grupos étnicos, por medio del cálculo de distancias genéticas entre poblaciones y construcción de árboles filogenéticos, con el fin de comprender las influencias de las antiguas migraciones sobre la constitución genética de las poblaciones actuales.

4. Materiales y Métodos

4.1- Panel de individuos a tipificar

Se dispone de los siguientes muestras: ADN de 30 individuos caucásicos de Buenos y suburbios con ancestros criollos, españoles o italianos; muestras de sangre de 90 individuos de una tribu Mapuche de la provincia de Neuquén, a las cuales se realizó una extracción de ADN; ADN de 16 individuos Mataco-Wichi que habitan en las cercanías de Orán, Salta y de 50 Chiriguanos de la misma región. Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas usando EDTA 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. Se los encuentra en la provincia de Río Negro, Chubut y Neuquén [56, 57].

Los wichis proceden de la reserva denominada "territorio fiscal" ubicada cerca de la ciudad de Orán. Esta comunidad es una población cerrada de aproximadamente 5000 individuos. La lengua es mataco que pertenece a la subfamilia lingüística Macro-Panoan y al grupo Ecuatoriano-Tucanoam. La mayoría provienen de la región de Embarcación.

La comunidad chiriguana, no llega a ser tan cerrada como la Wichi. Pertenecen al grupo lingüístico Ecuatoriano-Tucanoam, a la subfamilia tupí-guaraní. Se extendieron por Paraguay, Bolivia y ya habían penetrado en el actual territorio argentino a la entrada 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 .

4.2- Tipificación molecular de los alelos HLA-C por PCR-SSO

Se realiza según la metodología descripta por Levine y Yang [35]. Para la tipificación molecular de los alelos HLA-C primero se extrae el ADN genómico a partir de sangre periférica, para luego amplificar un fragmento de 909 pb que contiene los exones 2 y 3, y los intrones 1 y 2 del locus HLA-C [58] por la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR). Posteriormente, el ADN amplificado se hibrida con un panel de 52 oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) marcados radioactivamente, que son complementarios a regiones polimórficas de los exones 2 y 3 previamente amplificados.

4.2.1- Extracción de ADN genómico

Se realiza por la técnica de Salting-out [59]. Partiendo de 350 µl de sangre periférica con EDTA 5% 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 10.000 r.p.m.) descartando el sobrenadante. El proceso se repite 3 veces. El pellet así obtenido se resuspendió en 250 µl de buffer K (50 µM ClK; 10 µM Tris ph=7,4; 2,5 µM Cl₂Mg; 0,5 % del detergente NP40; 125 µg/ml de proteinasa K) y se incubó por 60 min. a 55° C para romper los glóbulos blancos. Luego se agregaron 240 µl de ClNa 2,5 M y se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 min. a fin de precipitar las proteínas. Se recuperó el sobrenadante en un eppendorf y se 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 4 minutos de una centrifugación a 10.000 r.p.m. se descartó el etanol. Se realizaron dos lavados con etanol 70 %, se dejó secar y se resuspendió el ADN en agua (la cantidad de agua varió entre 50 a 300 µl, dependiendo del tamaño del pellet).

4.2.2- Amplificación por PCR

La estrategia de amplificación para la tipificación de los alelos HLA-C consiste en la utilización de *primers* intrónicos, denominados 5CIn1-61 y 3BCIn3-12, que pegan en los intrones 1 y 3 respectivamente. Estos *primers* permiten obtener una amplificación específica del locus C de la región que comprende parte del intrón 1 y los exones 2, 3 e intrón 2 enteros (Fig. 10) [58].

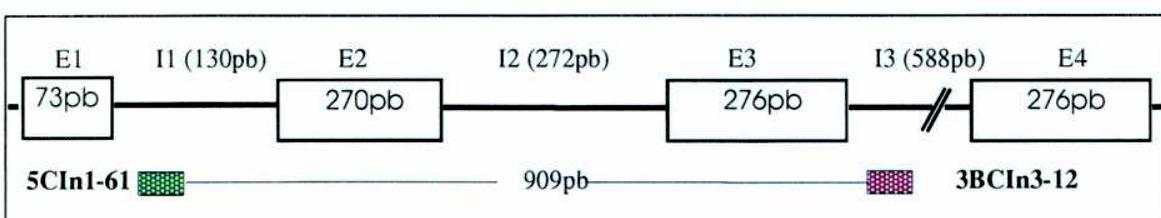


Figura 10: Estrategia de amplificación del locus HLA-C.

Esta amplificación es específica ya que sólo permite amplificar el locus HLA-C y no

cualquier otro loci HLA, pero se dice que es genérica en el sentido de que permite amplificar **todos** los alelos de este locus. Hasta julio de 1998 [18] se conocían 45 alelos pertenecientes al locus HLA-C, los cuales son listados en la **Tabla 3**.

En la **Tabla 4** se muestran los *primers* antes mencionados.

ALELOS PERTENECIENTES AL LOCUS HLA-C N = 45	
Cw*0102	CW*0803
Cw*0103	CW*12021
Cw*02021	CW*12022
Cw*02022	CW*1203
Cw*02023	CW*12041
Cw*02024	CW*12042
Cw*0302	CW*1205
Cw*0303	CW*1301
Cw*03041	CW*1402
Cw*0401	CW*1403
Cw*0402	CW*1502
Cw*0403	CW*1503
Cw*0501	CW*1504
Cw*0602	CW*15051
Cw*0701	CW*15052
Cw*0702	CW*1601
Cw*0703	CW*1602
Cw*0704	CW*16041
Cw*0705	CW*1701
Cw*0706	CW*1702
Cw*0707	CW*1801
Cw*0801	CW*1802
Cw*0802	

Tabla 3: Alelos pertenecientes al locus HLA-C.

PRIMER	posición	Secuencias (5'- 3')	largo
5CIn 1-61	intrón 1: 42-61	AGCGAGG(GT)GCCCGCCGGCGA	21
3BCIn 3-12	intrón 3: 12-35	GGAGATGGGAAAGGCTCCCCACT	23

() indica posición degenerada

Tabla 4: Primers utilizados para la amplificación por PCR del locus HLA-C. Se indica el nombre, la posición donde se unen (codones), la secuencia y el largo.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, con 200-500 ng de ADN, 1 U de Taq DNA polimerasa , 20 pmoles (0,4 µM) de cada primer, 5 µl de Buffer 10X (150 mM SO₄(NH₄)₂, 500 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 15 mM Cl₂Mg, 0,1% (p/v) gelatina, 100 mM β-mercапto), 0,25 mM de dNTPs, 17 µl de Glicerol (30%) y agua destilada hasta completar 50 µl. La reacción se cubrió con 2 gotas de aceite mineral para

evitar la evaporación y se llevó a cabo en un termociclador MJ Research. El buffer fue preparado según la metodología descripta por Cereb et al. [58], al cual se le probaron algunas modificaciones (las condiciones adecuadas ya fueron mostradas). También fueron probadas diferentes temperaturas de "annealing" a partir de las condiciones recomendadas en el protocolo del XII Workshop Internacional de Histocompatibilidad hasta encontrar la óptima. Todo esto permitió la puesta a punto de la amplificación por PCR.

La eficiencia de la amplificación se analizó por electroforesis de una alícuota de 2 µl en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio 0,5 µg/ml, usando como buffer de corrida TBE (Tris-borato-EDTA) y como buffer de siembra: ficoll 15% con azul de bromofenol 0,05%. Luego de correr las muestras durante aproximadamente 40 minutos a 50 Volts, el producto de PCR fue visualizado en un transiluminador de luz UV.

<i>Amplificación</i>	<i>Temp. inicial (°C)</i>	<i>Tiempo (seg.)</i>	<i>Temp. annealing (°C)</i>	<i>Tiempo (seg.)</i>	<i>Temp. final (°C)</i>	<i>Tiempo (seg.)</i>	<i>Número de ciclos</i>
Función	Desnaturalización		Pegado específico de primers		Extensión		
GENERICAS	96	50	65	60	72	60	primeros 20 ciclos
	96	50	65	60	72	60	segundos 15 ciclos

Tabla 5: Programa de PCR empleado para la amplificación genérica del *locus C*. El programa incluye un paso inicial de desnaturalización a 96°C, durante 5 minutos y un último paso de extensión a 72°C, durante 10 minutos. La cantidad de ciclos totales es de 35, y se utilizan dos temperaturas de annealing diferentes (ciclos concatenados).

Las condiciones óptimas de amplificación se muestran en la **Tabla 5**. Antes de la iniciación de los 35 ciclos se precalientan las muestras a 96°C por 5 minutos y al finalizar los ciclos se dejan 10 minutos a 72°C con el fin de que la extensión se complete en todas las copias.

En todas las amplificaciones se usó como control positivo una muestra de ADN perteneciente al panel de individuos caucásicos de Buenos Aires y suburbios (también fue utilizada para la puesta a punto de la PCR), y como control negativo se incluyó un tubo donde se reemplazó la muestra de ADN por H₂O

4.2.3- Hibridación con oligonucleótidos específicos

4.2.3.1- Preparación y siembra de las membranas

Fueron cortadas 18 membranas de nylon (cuyo tamaño depende del número de muestras a tipificar) para ser hibridadas tres veces cada una. Las mismas se sumergieron en agua destilada por 10 minutos, luego en SSPE 10X (SSPE 20X: 3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA pH=7,4) por 15 minutos y se secaron en estufa a 60°C. Luego, 2 µl del producto de PCR amplificado de cada muestra se sembró en las membranas con una pipeta multicanal Hamilton (seis u ocho muestras por fila). Una vez sembradas todas las muestras, las membranas se colocaron por 10 minutos en NaOH 0,4 N con el fin de desnaturizar las hebras de ADN, luego en SSPE 10X por el mismo tiempo y por último se fijó el ADN a las membranas con luz UV, en un UV Stratalinker 1800 de Stratagene.

4.2.3.2- Marcación de las sondas oligonucleotídicas

La marcación de cada sonda (en el extremo 5') se realizó incubando por 30 minutos a 37°C la siguiente mezcla de reacción (volumen final de 25 µl): 3 pmoles del oligonucleótido específico de secuencia (SSO), 2,5 µl de Buffer Kinasa 10X (0,5 M Tris-HCl pH= 7,6, 0,1 M de Cl₂Mg , 50 mM de DTT, 1 mM de espermidina HCl), 30 µCi de [³²P]γ-dATP, 10 U de T4 polinucleótido kinasa (0,5 µl).

4.2.3.3- Hibridación de las membranas

El procedimiento de hibridación de las membranas comprende tres etapas: una primera de prehibridación, la hibridación propiamente dicha y por último los lavados.

La prehibridación se realiza para impedir el eventual pegado inespecífico del radiactivo. Para tal fin, las membranas se colocaron en una incubadora de Robbins Scientific por lo menos 45 minutos a 42°C, con 3 ml de una solución que contiene la siguiente composición: 6X SSPE, 5X Denhardt (Denhardt 100X: 2% Ficoll, 2% polivinilpirrolidina (PVP), 0,02 gr/ml BSA), 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón (SSS). Para la hibridación, se le agregó a la solución recién mencionada el oligonucleótido marcado (3 pmoles) y se incubó a la misma temperatura por 1 hora.

Una vez transcurrido este tiempo, se descartó la solución de hibridación y se procedió al lavado de las membranas. Éstas se lavaron dos veces con 2X SSPE, 0,1% SDS durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego con una solución de cloruro de tetrametilamonio (TMAC) (50 mM Tris-HCl pH=8, 3 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 controles positivos y negativos de hibridación.

Los resultados se obtuvieron por autorradiografía 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 20 minutos, y luego se colocaron a la misma temperatura con una solución que contiene: 0,2 M Tris, 0,14X SSPE y 0,14X SDS, durante otros 20 minutos. Luego de este proceso se debe empezar nuevamente con la prehibridación.

La **Tabla 6** muestra el nombre, secuencia, posición donde hibridan y temperatura de lavado con TMAC de los oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) utilizados como sondas.

En la **Tabla 7** se enumeran las especificidades de cada SSO.

NOMBRE	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	CODONES	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	TEMP. DE LAVADO (°C)
CI-203	GG TAT TTC TCC ACA TCC GT	6-12	RYFSTSV	59.5
C7-C6	GG TAT TTC GAC ACC GCC GT	6-12	RYFDTAV	56.5
A5	TAT TTC ACA TCC GTG T	7-13	YFFTSVS	59.5
A6	TAT TTC TAC ACC TCC GTG T	7-13	YFYTSVS	56.5
C2	TG TCC CGG CCC AGC CGC GG	12-18	VSRPSRG	59.5
C-0703	CGG CCC GGC GCC GGA GAG C	14-20	RPGAGEP	56.5
C2-C15	GC GGA GAG CCC CAC TTC AT	17-23	RGEPHFI	59.5
C 1402	GC GGG GAG CCC CGC TTC AT	17-23	RGEPRFI	57.5
C 1403	GC GGG GAG CCC CAC TTC AT	17-23	RGEPHFI	59.5
A 126	C GGA GAG CCC CGC TTC ATC	17-23	GEPRFI	60.0
C8-C5	CAG TTC GTG CAG TTC GAC A	32-38	QFVQFDS	59.5
B54-C	GT CCG AGA GGG GAG CCG CG	42-48	SPRGEPR	59.5
C-1301	A AGA GGG GAG CCC CGG GCG	43-49	PRGEPR	57.5
C-0402	CG CGG AGC CGC TGG GTG GA	47-54	PRSRWVEQ	57.5
CIC-213B	CAG AAG TAC AAG CGC CAG G	65-71	QKYKRQA	59.5
CIC-201	CAG GCA CAG GCT GAC CGA G	70-76	QAQADR	60.0
CIC-202	CAG GCA CAG ACT GAC CGA G	70-76	QAQTDR	59.5

CIC-203	G TG AAC CTG CGG AAA CTG C	76-82	VNLRKL	58.5
CIC-204	G TG AGC CTG CGG AAC CTG C	76-82	VSLRNL	60.0
C-02021	T G CGG AAA CTA CGC GGC TA	78-84	LRKLRGY	57.5
C-0303	CAG AGC GAG GCC A <u>GTGAGT</u>	86-89- <i>Int2</i>	QSEA	58.5
C-0304	AGC GAG GCC G <u>GTGAGTGAC</u>	87-89- <i>Int2</i>	SEA	59.5
CI-324	GG TCT CAC ATC ATC CAG AG	91-97	GSHI IQR	59.5
CI-320	C CTC CAG AAT ATG TAT GGC	94-100	TLQNMYYG	57.5
CI-326	CTC CAG TGG ATG TAT GGC T	95-101	LQWMYGC	60.0
CI-325	C CAG AGG ATG TAC GGC TGC	95-101	LQRMYGC	57.5
C 14	TC CAG TGG ATG TTT GGC TG	95-101	LQWMFGC	57.5
CI-328B	AG AGG ATG TCT GGC TGC GA	96-102	QRMSGCD	59.5
CI-329C	TC GCA GCC AAA CAT CCT CT	96-102	QRMFGCD	59.5
C-0701	AG AGG ATG TAT GGC TGC GA	96-102	QRMYGCD	59.5
CI-335	C GGG TAT AAC CAG TTC GCC	111-117	RGYNQFA	59.5
CI-341	C GGG TAT GAC CAG TCC GCC	111-117	RGYDQSA	59.5
CI-342D	C GGG TA(TC) GAC CAG TAC GCC	111-117	RGYDQYA	60.0
CI-357	GGG CAT GAC CAG TTC GCC T	112-118	GHDQFAY	57.5
C-15	C GGG CAT GAC CAG TTA GCC	111-117	RGHDQLA	58.5
C12-13	C TGG ACC GCT GCG GAC ACG	132-138	SWTAADT	57.5
C 1203	C TGG ACT GCC GCG GAC ACG	132-138	SWTAADT	60.0
C7-C1	ACC GCC GCG GAC ACC GCG G	134-140	AADTAA	56.5
C 0802	ACC GCC GCG GAC AAG GCG G	134-140	AADKAA	57.5
C 0801	ACC GCC GCG GAC ACG GCG G	134-140	AADTAA	56.5
C8	GCG GCC CGT ACG GCG GAG C	149-155	AARTAEQ	59.5
C7	GT GCG GCG GAG CAG CTG AG	151-157	RAAEQLR	58.5
CI-346	GT GAG GCG GAG CAG CGG AG	151-157	REAEQRR	59.5
CI-347	GT GAG GCG GAG CAG CTG AG	151-157	REAEQLR	60.0
CI-348	GT GAG GCG GAG CAG TGG AG	151-157	REAEQWR	60.0
CIC-205	CG GAG CAG CAG AGA GCC TA	153-159	AEQQRAY	57.5
CI-396	CG GAG CAG GAC AGA GCC TA	153-159	AEQDRAY	59.5
CI-350	CTG GAG GGC GAG TGC GTG G	160-166	LEGECVE	59.5
570	CTG GAG GGA CTG TGC GTG G	160-166	LEGLCVE	57.5
CI-351	GC CTG TGC GTG GAG TGG CT	162-168	GLCVEML	59.5
C-0803	CTG GAG AAC AGG AAG AAG A	172-178	LENRKKT	58.5
595	CTG GAG AAC GGG AAG AAG A	172-178	LENGKKT	58.5

Tabla6: Nombre, secuencia nucleotídica y aminoacídica, posición donde hibrida (codones) y temperatura de lavado con TMAC de cada oligonucleótido específico de secuencia (SSO) utilizado como sonda.

alelo	C 1 2 0 3	C 7 C 6	A 5	A 6	C 2	C 0	C 7	C 1	C 1	C 2	A 1	C 8	B 5	C 1	C 0	C 4	C I	C I	C I	C I	C 0	C 2	C 0	C 3	C I	C I	C I	C I	C 3	C 2	C 8	C B
*0102		+										+	+		+		+		+		+											
*0103		+										+	+		+		+		+		+											
*02021			+	+								+			+		+		+		+											
*02022			+	+								+			+		+		+		+											
*02023			+	+								+			+		+		+		+											
*02024			+	+								+			+		+		+		+											
*0302			+		+							+			+		+		+		+											
*0303			+		+							+			+		+		+		+		+		+							
*03041			+		+							+			+		+		+		+		+		+							
*0401	+											+				+	+		+											+		
*0402	+											+			+		+		+											+		
*0403		+	+									+			+	+	+		+										+			
*0501												+	+			+		+	+										+			
*0602	+											+			+	+	+		+													
*0701	+											+	+			+		+		+												
*0702	+											+	+		+	+	+		+										+			
*0703	+				+							+	+		+	+	+		+										+			
*0704	+											+			+	+	+		+													
*0705	+											+	+		+	+	+		+										+			
*0706	+											+	+		+	+	+		+													
*0707	+											+	+		+	+	+		+										+			
*0801												+	+			+		+		+												
*0802												+	+			+		+		+									+			
*0803												+	+			+		+		+												
*12021												+			+	+		+														
*12022												+			+	+		+														
*1203												+			+	+		+		+									+			
*12041												+	+		+	+		+														
*12042												+			+	+		+														
*1205												+			+		+		+													
*1301												+			+	+	+		+													
*1402	+											+			+		+		+													
*1403	+											+				+		+		+												
*1502												+						+	+											+		
*1503												+						+	+											+		
*1504												+						+	+											+		
*15051												+							+	+										+		
*15052												+							+	+										+		
*1601												+							+	+										+		
*1602												+							+	+												
*16041												+							+	+												
*1701												+						+	+											+		
*1702												+	+			+	+	+														
*1801	+											+				+	+	+												+		
*1802	+											+				+	+	+												+		

alelo	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
	I	I	1	0	I	I	I	I	1	7	0	0	1	1	8	7	C	I	I	I	I	7	C	I	
*0102									+	+								+							
*0103											+							+							
*02021	+				+														+			+			
*02022	+					+														+			+		
*02023					+	+														+			+		
*02024	+					+					+									+			+		
*0302					+	+					+							+							+
*0303							+				+							+							+
*03041					+	+					+							+							+
*0401											+								+						
*0402												+													
*0403													+							+					
*0501					+						+							+							+
*0602	+					+					+									+					
*0701					+	+					+								+						
*0702							+				+									+					
*0703							+												+						+
*0704					+						+										+				+
*0705							+				+									+					
*0706					+	+					+									+					
*0707						+					+									+					
*0801												+						+							+
*0802													+							+					+
*0803													+												+
*12021	+					+							+								+				
*12022	+						+						+								+				
*1203	+					+								+							+				
*12041	+					+							+								+				
*12042	+					+								+							+				
*1205	+					+								+							+				
*1301	+					+								+							+				
*1402					+	+							+							+					
*1403						+	+						+							+					
*1502						+					+		+								+				
*1503							+				+		+								+				
*1504						+	+						+								+				
*15051						+	+						+								+				
*15052						+	+						+								+				
*1601						+	+						+									+			
*1602						+	+						+										+		
*16041						+	+						+												
*1701							+													+					+
*1702							+													+					+
*1801													+							+					
*1802													+							+					

Tabla 7: Especificidad de los SSO.

4.3- Comparación entre la tipificación por serología y por PCR-SSO

Esta comparación fue establecida para la población Caucásica de Buenos Aires y suburbios (número de individuos (N) = 30) y para las muestras pertenecientes a líneas celulares del 10º Workshop de Histocompatibilidad (N = 17), las cuales fueron utilizadas para la "estandarización" del método de tipificación molecular (PCR-SSO). La tipificación serológica para la población de Buenos Aires fue realizada en nuestro laboratorio (ver tipificación por serología) y la de las líneas celulares fue reportada por el 10º Workshop. Para todas las muestras la tipificación por PCR-SSO fue obtenida en el presente estudio. La comparación se hizo a nivel de los alelos y los cálculos realizados se muestran en la **Tabla 8.**[50].

Serología → PCR-SSO	Cálculo
blanco → antígeno	Porcentaje de alelos cuya tipificación no pudo ser determinada por serología, pero si por PCR-SSO.
antígeno → antígeno	Porcentaje de alelos cuya tipificación por serología fue incorrecta comparado con la realizada por PCR-SSO.
antígeno → blanco	Porcentaje de alelos cuya tipificación por serología fue adicional, ya que la muestra resultó ser homocigota por PCR-SSO.

Tabla 8: Se muestran los tres tipos de discrepancias que se observan al comparar la tipificación por serología y por PCR-SSO.

4.4- Estudios genético-poblacionales y estadística

4.4.1- Cálculo de frecuencias antigénicas y alélica

Las frecuencias antigénica fueron calculadas para cada alelo como el número de individuos portadores de ese alelo (N antigénico) dividido el total de individuos de esa población.

El cálculo de las frecuencias alélicas o génicas se realizó por dos métodos distintos:

- Conteo directo: número de individuos portadores de un determinado alelo mas número de homocigotas para ese alelo (N alélico) dividido el número total de alelos en la población.
- Método de máxima verosimilitud utilizando el programa Arlequín [60].

Ambos tipos de frecuencias se expresaron en porcentaje.

4.4.2- Cálculo de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

Las frecuencias de los haplotipos DRB1-DQB1-C también se obtuvieron por el método de máxima verosimilitud por un procedimiento de conteo génico con el programa Arlequín.

La tipificación de los loci DRB1 y DQB1 para las poblaciones de Caucásicos de Buenos Aires, Wichis y Chiriguano fue obtenida anteriormente en nuestro laboratorio por el Dr. Marcelo Pando.

El desequilibrio de ligamiento se evaluó usando el índice D [41, 61], donde:

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

siendo

x_i : frecuencia observada del haplotipo i.

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

Este valor de D obtenido es dependiente de las frecuencias p y q . Por lo tanto para poder comparar valores de desequilibrio entre diferentes poblaciones se usa el índice D corregido (D'), el cual se calcula de la siguiente manera:

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

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 de χ^2 (Chi 2) con un grado de libertad ($P < 0.05$) donde:

$$X^2 = n \cdot r^2$$

y $r^2 = D^2 / p \cdot q \cdot (1-p) \cdot (1-q)$; n: número total de gametas en la muestra.

4.4.3- Test de Ewens-Watterson

La realización de este test requiere que las poblaciones estén en equilibrio. Por este motivo, primero se determinó si las poblaciones estudiadas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus HLA-C. El estadístico de homocigosis observado (F_{obs}) usado en el test de Ewens-Watterson se calcula como:

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

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 presentes en cada población [32]. Tanto el equilibrio de Hardy-Weinberg como el test de Ewens-Watterson se realizaron con el programa Arlequín [60].

4.4.4- Análisis filogenético

Para llevar a cabo este análisis se utilizaron las frecuencias alélicas (o génicas) del locus HLA-C de las cuatro poblaciones analizadas en el presente estudio y las correspondientes a otras 16 poblaciones. Los datos de estas últimas fueron sacados de la bibliografía [42].

De este modo las frecuencias alélicas de un total de 21 poblaciones fueron utilizadas para calcular una matriz de distancias genéticas. Se incluyeron las siguientes poblaciones: cuatro amerindias (argentinas: Mapuches(1), Chiriguáos(1), Matacos-Wichis(1) y de Brasil-Colombia: Ticuna(1)); diez poblaciones caucásicas (Argentina(1), Italia(2), España(1), Alemania(1) [62], Inglaterra(1), Francia(1), Bélgica(1), Portugal(1) y Suiza(1)); cinco africanas (Argelia(1), Sudáfrica(1), Bubi de Guinea Ecuatorial(1) y

Sudán(2)) y dos asiáticas (Corea(1) y Japón(1)).

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

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

donde m indica que se suma a lo largo de cada loci, i a lo largo de 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 fenogramas se utilizaron dos métodos de agrupamiento que utilizan diferentes algoritmos, el método de la unión de vecinos o Neighbor-joining (NJ) y el Unweighted Pairs-Group Method using arithmetic Averages (UPGMA).

NJ

Este método no asume una tasa de evolución constante y su propósito es encontrar unidades taxonómicas operativas (OTUs) vecinas en forma secuencial de manera tal que se minimice la suma de todas las distancias posibles entre OTUs dentro del árbol. El árbol que se obtiene aplicando este método carece de raíz [63].

UPGMA

En este caso, se asume una tasa de evolución constante de manera tal que existe una relación lineal entre distancia genética y tiempo de divergencia. Para la construcción del árbol (con raíz), primero identifica las dos OTUs más próximas (que posean la mínima distancia evolutiva) y estas son tratadas como una OTU compuesta, luego identifica cual OTU es más cercana a la compuesta y así, procede de la misma manera hasta que queden sólo dos OTUs [63].

En los árboles obtenidos con ambos métodos el largo de las ramas es proporcional a las

distancias genéticas entre poblaciones.

La construcción de las matrices de distancia y de los fenogramas fue realizado con el programa Phylip [64].

5. Resultados

5.1- Tipificación molecular de los alelos del locus HLA-C

Se tipificaron por PCR-SSO individuos de las poblaciones: Mapuche, Chiriguano, Mataco-Wichi y caucásicos de Buenos Aires y suburbios, por amplificación de un fragmento de 909 pb que contiene los exones 2 y 3 (PCR) y posterior hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) como se describe en Materiales y Métodos. Los *primers* utilizados son el 5CIn1-61 y 3BCIn3-12, los cuales son específicos del locus C y permiten amplificar todos los alelos del mismo (**Tabla 3**: Materiales y Métodos). Las condiciones óptimas de amplificación fueron puestas a punto (**Tabla 5**: Materiales y Métodos) para obtener suficiente cantidad de producto altamente específico. Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio (**Fig. 11**).



Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR. Se indica el tamaño del fragmento amplificado en pares de bases (pb). Corte 1: control negativo; 2, 3, 5, 6 y 7: muestras conteniendo el fragmento de 909 pb; 4: líder de 100 pb.

La hibridación con un panel de 52 oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) marcados con [^{32}P] γ -dATP permitió asignar (luego de autorradiografía) los alelos HLA-C

correspondientes. La asignación se realizó analizando para cada muestra el patrón de resultados positivos y negativos obtenido con todo el conjunto de sondas (Fig. 12).

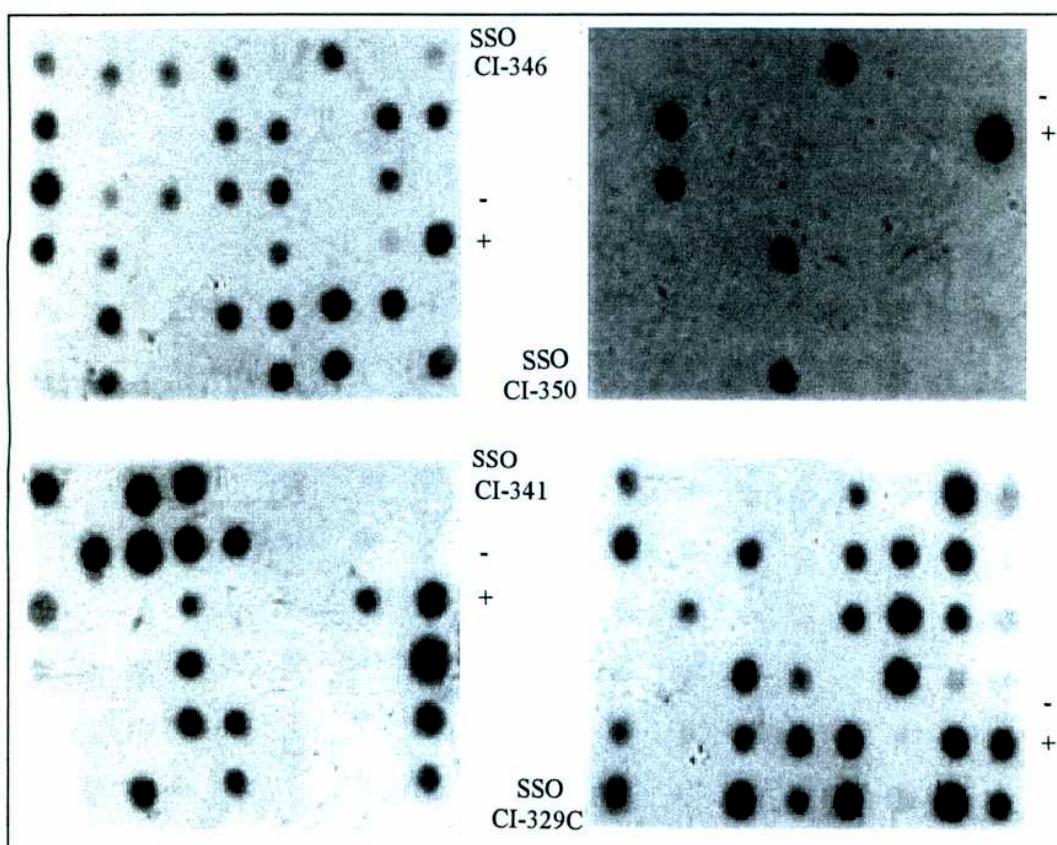


Figura 12: Autorradiografía de las membranas de nylon usadas para la tipificación de los alelos HLA-C. Cada membrana corresponde a un SSO y cada muestra está repetida en todas las membranas en la misma posición. La lectura del patrón de positivos y negativos permite asignar para cada muestra los alelos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

Algunas consideraciones de la tipificación

En una muestra de la población Mapuche se observó un patrón de hibridación raro al cual no se le pudo asignar ninguno de los alelos conocidos hasta el momento. Su patrón se parece al observado para el alelo Cw*0707. La tipificación para esta muestra fue repetida, para descartar todo tipo de error experimental, observándose el mismo patrón. Ésto permitió pensar que se podía estar en presencia de un alelo nuevo (no caracterizado hasta el momento), al cual se denominó Cw*0707v (v por variante). Para la confirmación de esta hipótesis se procederá a secuenciar esta muestra.

5.2- Comparación entre la tipificación por serología y por PCR-SSO

La comparación se realizó para la población de caucásicos de Buenos Aires y suburbios y para las muestras correspondientes a líneas celulares del 10º Workshop de Histocompatibilidad. Los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Serología → PCR-SSO	Caucásicos (n=60)	Líneas celulares (n=34)
blanco → antígeno	30,0% (n=18)	0,0% (n=0)
antígeno → antígeno	3,3% (n=2)	14,7% (n=5)
antígeno → blanco	0,0% (n=0)	0,0% (n=0)
Total	33,3% (n=20)	14,7% (n=5)

Tabla 9: Discrepancias observadas entre la tipificación por serología y por PCR-SSO. n: número de alelos.

5.3- Análisis de frecuencias

Una vez obtenida la tipificación de cada individuo se calcularon las frecuencias antigénicas y alélicas o génicas (por conteo directo y por el método de máxima verosimilitud) de las cuatro poblaciones analizadas (**Tabla 10 y 11**).

En la población mapuche se detectaron 25 alelos del locus HLA-C diferentes. De los 90 individuos estudiados, el 56,67% porta el alelo Cw*0702; otros alelos frecuentes resultaron ser el Cw*0401 (24,44%) y el *0701 (17,78%). Las respectivas frecuencias alélicas de estos alelos son: 33,78 %, 14,03% y 9,19%. Los alelos Cw*0802 y *03041 aparecen con frecuencias alélicas cercanas al 5% mientras que todos los demás alelos lo hacen con frecuencias menores. Seis alelos fueron encontrados únicamente en esta población, los mismos son: Cw*0103, *02023, *0704, *0707v, *15051 y *1801 (**Tabla 10-A**).

En la población de Chiriguano estudiada (50 individuos) se observó el predominio de los alelos Cw*0401 y *03041, en el 44% y 42% de los individuos respectivamente. Dos

individuos presentaron el alelo Cw*0803, mientras que el Cw*0302 y el *1503 se encontraron en un individuo cada uno respectivamente. Los tres alelos estuvieron ausentes en las demás poblaciones estudiadas. Otros alelos observados en frecuencias alélicas iguales o menores al 8% fueron el Cw*0102, *02021, *02022, *0303, *0501, *0702, *0703, *0801, *0802, *1402 y *1502 sumando un total de 16 variantes alélicas distintas (**Tabla 10-B**).

En los 16 indios de la tribu Mataco-Wichi la diversidad alélica se redujo considerablemente, encontrándose sólo siete alelos. En este caso el alelo predominante es el Cw*0303, presente en el 50% de los individuos (frecuencia alélica= 29,71%). El segundo alelo más frecuente resultó ser el Cw*0401 (31,25%) , seguido por los alelos: Cw*0102 (25%), *03041 (25%) y *0703 (25%). Las frecuencias alélicas de estos alelos son: 19,82%, 14,37%, 12,5% y 12,5% respectivamente. Frecuencias aleicas cercanas al 3% fueron observadas para los alelos restantes, Cw*0501 y *0702 (**Tabla 10-C**).

En la población caucásica estudiada fueron encontrados 21 alelos diferentes. Algunos de ellos (el Cw*0403, *12042 y *1702) resultan únicos de los individuos caucásicos, ya que se encontraron ausentes en todas las poblaciones indígenas. En éste caso los alelos Cw* 0401, *0701 y *0702 se encuentran presentes con las frecuencias alélicas más altas (13,33%, 13,33% y 10,00% respectivamente), seguidos por Cw*12021 y *1203 (**Tabla 10-D**).

A) Mapuches

Nº de individuos = 90, Nº de alelos = 180

<i>alelo</i>	<i>N antigénico</i>	<i>número de homocigotas</i>	<i>N alélico</i>	<i>Frecuencia antigénica (%)</i>	<i>Frecuencia alélica (%)</i>
*0102	4	0	4	4.44	2.22
*0103	1	0	1	1.11	0.56
*02021	2	0	2	2.22	1.11
*02022	2	0	2	2.22	1.11
*02023	1	0	1	1.11	0.56
*03041	8	1	9	8.89	5
*0401	22	5	27	24.44	15
*0501	3	0	3	3.33	1.67
*0602	2	0	2	2.22	1.11
*0701	16	1	17	17.78	9.44
*0702	51	12	63	56.67	35
*0704	1	0	1	1.11	0.56
*0707	1	0	1	1.11	0.56
*0707v	1	1	2	1.11	1.11
*0801	2	0	2	2.22	1.11
*0802	9	0	9	10	5
*0803	5	0	5	5.56	2.78
*12021	2	0	2	2.22	1.11
*1203	3	0	3	3.33	1.67
*1301	2	1	3	2.22	1.67
*1502	6	0	6	6.67	3.33
*15051	1	0	1	1.11	0.56
*1601	7	0	7	7.78	3.89
*1701	3	0	3	3.33	1.67
*1801	4	0	4	4.44	2.22

B) Chiriguanos

Nº de individuos = 50, Nº de alelos = 100

<i>alelo</i>	<i>N</i> <i>antigénico</i>	<i>número de</i> <i>homocigotas</i>	<i>N alélico</i>	<i>Frecuencia</i> <i>antigénica</i> (%)	<i>Frecuencia</i> <i>alélica (%)</i>
*0102	3	0	3	6	3
*02021	1	0	1	2	1
*02022	2	0	2	4	2
*0302	1	0	1	2	1
*0303	8	0	8	16	8
*03041	21	2	23	42	23
*0401	22	8	30	44	30
*0501	2	0	2	4	2
*0702	6	2	8	12	8
*0703	6	1	7	12	7
*0801	6	1	7	12	7
*0802	1	0	1	2	1
*0803	2	0	2	4	2
*1402	1	0	1	2	1
*1502	3	0	3	6	3
*1503	1	0	1	2	1

C) Wichis

Nº de individuos = 16, Nº de alelos = 32

<i>alelo</i>	<i>N</i> <i>antigénico</i>	<i>número de</i> <i>homocigotas</i>	<i>N alélico</i>	<i>Frecuencia</i> <i>antigénica</i> (%)	<i>Frecuencia</i> <i>alélica (%)</i>
*0102	4	1	5	25	15.63
*0303	8	2	10	50	31.25
*03041	4	0	4	25	12.5
*0401	5	2	7	31.25	21.88
*0501	1	0	1	6.25	3.13
*0702	1	0	1	6.25	3.13
*0703	4	0	4	25	12.5

D) Caucásicos

Nº de individuos = 30, Nº de alelos = 60

<i>alelo</i>	<i>N</i> antigénico	<i>número de</i> <i>homocigotas</i>	<i>N</i> alélico	<i>Frecuencia</i> <i>antigénica</i> (%)	<i>Frecuencia</i> <i>alélica (%)</i>
*0102	1	0	1	3.33	1.67
*02021	1	0	1	3.33	1.67
*02022	1	0	1	3.33	1.67
*0303	3	0	3	10	5
*03041	2	0	2	6.67	3.33
*0401	7	1	8	23.33	13.33
*0403	1	0	1	3.33	1.67
*0501	3	0	3	10	5
*0602	2	0	2	6.67	3.33
*0701	6	2	8	20	13.33
*0702	6	0	6	20	10
*0707	2	0	2	6.67	3.33
*0802	2	0	2	6.67	3.33
*12021	5	0	5	16.67	8.33
*1203	5	0	5	16.67	8.33
*12042	1	0	1	3.33	1.67
*1301	2	0	2	6.67	3.33
*1502	2	0	2	6.67	3.33
*1601	2	0	2	6.67	3.33
*1701	2	0	2	6.67	3.33
*1702	1	0	1	3.33	1.67

Tabla 10: Frecuencias antigénicas y alélicas (por conteo directo) encontradas en cuatro poblaciones argentinas para el locus HLA-C. A) Mapuche; B) Chiriguano; C) Mataco-Wichi; D) Caucásicos de Buenos Aires y suburbios. Se indican en negrita los alelos predominantes.

alelos	Frecuencias alélicas (%)			
	Mapuches	Chiriguanos	Wichis	Caucásicos
*0102	2.22	3.00	14.37	1.67
*0103	0.56			
*02021	1.11	1.00		1.67
*02022	1.11	2.00		1.67
*02023	0.56			
*0302		1.00		
*0303		8.00	29.71	5.00
*03041	4.66	22.35	12.50	3.33
*0401	14.03	27.78	19.82	13.33
*0403				1.67
*0501	1.67	2.00	3.13	5.00
*0602	1.11			3.33
*0701	9.19			13.33
*0702	33.78	6.78	3.13	10.00
*0703		6.37	12.50	
*0704	0.56			
*0707	0.56			3.33
*0707v	0.60			
*0801	1.11	6.37		
*0802	5.00	1.00		3.33
*0803	2.78	2.00		
*12021	1.11			8.33
*1203	1.67			8.33
*12042				1.67
*1301	1.19			3.33
*1402		1.00		
*1502	3.33	3.00		3.33
*1503	0.56	1.00		
*15051				
*1601	3.89			3.33
*1701	1.67			3.33
*1702				1.67
*1801	2.22			
null	3.78	5.35	4.86	

Tabla 11: Frecuencias alélicas (o génica) del locus HLA-C calculadas por el método de máxima verosimilitud, para las cuatro poblaciones argentinas estudiadas. Notar que estas frecuencias difieren levemente de las calculadas por conteo directo (**Tabla 10**), excepto para la población caucásica en la cual por ambos métodos se obtuvieron frecuencias alélicas iguales.

5.4- Análisis de haplotipos

5.4.1- Haplótipos más frecuentes

Debe destacarse que este trabajo representa el primer estudio de haplotipos DRB1-DQB1-C hasta el momento. Las frecuencias haplotípicas se obtuvieron por el método de máxima verosimilitud por un procedimiento de conteo génico con el programa Arlequín [60].

Los resultados de los haplotipos más frecuentes para las poblaciones de Chiriguanos, Wichis y caucásicos se muestran en la **Tabla 12**. Los Mapuches no fueron incorporados en este análisis ni tampoco en el de desequilibrio de ligamiento, ya que no se contaba con la tipificación de los loci DRB1 y DQB1 necesaria.

Al analizar haplotipos y debido a que los loci DRB1 y DQB1 se hayan en fuerte desequilibrio de ligamiento, generalmente se observa que un determinado alelo de DRB1 aparece con un DQB1 particular. Como puede verse en la **Tabla 12**, este es el caso del DRB1*0802 con el DQB1*0402 en los Chiriguanos, el del DRB1*0404 con el DQB1*0302 en los Wichis o el del DRB1*0701 con el DQB1*0201 observado en los caucásicos, entre otros. Sin embargo, esto no ocurre con el locus HLA-C. Así, cada combinación DRB1-DQB1 aparece con varios alelos distintos del locus C, generalmente con el Cw*0401, en las tres poblaciones y con Cw*03041 en los Chiriguanos y Wichis. Otro aspecto que se destaca, es que las poblaciones indígenas presentan pocos haplotipos, algunos son compartidos por ambas, pero ninguno de los mismos se encuentra en la población Caucásica, es decir, les son propios. Entre los haplotipos compartidos, el DPB1*1402-DQB1*0301-Cw*0401 presenta una frecuencia alta en ambas poblaciones.

En los caucásicos de Buenos Aires y suburbios el haplotipo más frecuente es el DRB1*1101-DQB1*0301-Cw*12021($f=0.068$), seguido por otros con frecuencia de 0.045, entre los que menciono el DRB1*0701-DQB1*0201-Cw*0401 y el DRB1*1501-DQB1*0602-Cw*1203. Estos haplotipos junto con el DRB1*1302-DQB1*0604-Cw*0403 han sido previamente observados en esta y otras poblaciones caucásicas teniendo en cuenta sólo DRB1-DQB1. De hecho, el haplotipo DRB1*1101-DQA1*0501-DQB1*0301 es el más frecuente en poblaciones caucásicas de Italia. También presenta otros haplotipos cuyas combinaciones DRB1-DQB1 no fueron vistas en poblaciones caucásicas, por ejemplo el DRB1*0403-

DQB1*0302-Cw*0701, el cual ha sido reportado como DRB1*0403-DQA1*03011-DQB1*0302 para poblaciones amerindias (Chiriguanos, Wayuu, Yukpa, Zapoteco, Mixteco y Mixe). Posiblemente en los caucásicos la presencia de este haplotipo se deba a una contribución indígena.

En los Chiriguanos las frecuencias más altas se observan para el DRB1*1406-DQB1*0301-Cw*03041, DRB1*1602-DQB1*0301-Cw*0401 y DRB1*1402-DRB1*0301-Cw*0401, mientras que en los Wichis los haplotipos más frecuentes son el DRB1*0411-DQB1*0302-Cw*0303, DRB1*1402-DQB1*0301-Cw*0401 y DRB1*0802-DQB1*0402-Cw*0703. Las combinaciones DRB1-DQB1 que componen estos y otros haplotipos que se observan en la Tabla fueron encontradas previamente en estas poblaciones y en varias amerindias de México, Brasil, Colombia y Venezuela.

Por otro lado se puede destacar la presencia de dos haplotipos, el DRB1*1101-DQB1*0301-Cw*0702 (encontrado en la población Wichi) y el DRB1*0701-DQB1*0201-Cw*0303 (en ambas poblaciones), los cuales se han encontrado en alta frecuencia en los Caucásicos estudiados en el presente estudio pero en combinación con el alelo Cw*12021 y el Cw*0401 (o Cw*1601) respectivamente.

<i>Haplótipos DRB1-DQB1-C</i>	<i>Chiriguanos (f)</i>	<i>Wichis (f)</i>	<i>Caucásicos (f)</i>
0101-0301-0602			0.023
0301-0301-0701			0.023
0401-0502-0501			0.023
0403-0302-0401	0.010		
0403-0302-0701			0.045
0404-0301-02021			0.023
0404-0301-0501			0.023
0404-0302-0102		0.063	
0404-0302-0401	0.010	0.031	
0405-0303-0702			0.023
0407-0302-03041	0.040		
0411-0301-0703		0.031	
0411-0302-0303		0.188	
0411-0302-03041	0.023		
0411-0302-0801	0.017		
0417-0302-0303		0.031	

0701-0201-0303		0.031	
0701-0201-0401			0.045
0701-0201-1203			0.023
0701-0201-1601			0.045
0701-0303-0602			0.023
0701-0303-1202			0.023
0701-0501-1702			0.023
0801-0402-0501			0.023
0801-0402-1502			0.023
0801-0602-0401			0.023
0802-0402-0102		0.031	
0802-0402-03041	0.030		
0802-0402-0702	0.032		
0802-0402-0703	0.010	0.094	
0804-0402-0303		0.031	
0804-0402-0702	0.020		
0901-0302-0401			0.023
0901-0303-0303			0.023
1101-0301-0202			0.023
1101-0301-0702		0.031	
1101-0301-1202			0.068
1101-0301-1301			0.023
1102-0501-0102			0.023
1104-0402-0401			0.023
1302-0201-0802			0.023
1302-0604-0403			0.023
1303-0302-12042			0.023
1303-0501-1701			0.023
1402-0301-0102	0.030		
1402-0301-0303	0.021		
1402-0301-03041		0.063	
1402-0301-0401	0.070	0.111	
1402-0301-0703	0.030		
1402-0301-1502	0.030		
1406-0301-03041	0.094		
1406-0301-0401	0.056		
1406-0301-0501		0.031	
1406-0301-0801	0.033		
1406-0302-03041		0.031	
1409-0301-03041		0.031	
1501-0301-03041			0.023
1501-0602-0802			0.023
1501-0602-1203			0.045
1502-0601-1701			0.023
1601-0301-0303			0.023

1601-0301-0701			0.023
1601-0402-0702			0.023
1601-0502-0702			0.045
1601-0502-1203			0.023
1602-0301-0303	0.047		
1602-0301-0401	0.074		
1602-0602-1502			0.023

Tabla 12: Frecuencias (f) de los haplotipos más comunes de las poblaciones de Chiriguanos, Wichis y caucásicos. En negrita se muestran los haplotipos más frecuentes.

5.4.2- Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento se calculó entre los loci DRB1 y DQB1, DRB1 y C y entre DQB1 y C para las poblaciones de Chiriguanos, Wichis y caucásicos. Para las tres poblaciones el desequilibrio de ligamiento entre DRB1 y DQB1 resultó significativo ($p<0.05$) (datos no mostrados), lo cual concuerda con lo observado en la mayoría de las poblaciones anteriormente estudiadas. Para la población de Chiriguanos sólo se obtuvo desequilibrio significativo entre DQB1 y C. Por el contrario, en los Wichis éste fue observado únicamente entre DRB1 y C.

Para los caucásicos no se encontró desequilibrio de ligamiento significativo entre DRB1 y C ($p=0.11$), ni tampoco entre DQB1 y C ($p=0.58$). En la **Tablas 13-A** y **13-B** se muestran para los Chiriguanos y para los Wichis respectivamente sólo los haplotipos que presentaron desequilibrio de ligamiento significativo, mientras que para los caucásicos se presentan los resultados obtenidos entre DRB1 y C (**Tabla 13-C**), ya que a pesar de no encontrarse desequilibrio entre estos loci, se encuentran combinaciones asociadas significativamente (pero el número de haplotipos no significativos es muy alto; sólo se muestran cuatro). En todos los casos fue calculado el índice de desequilibrio D y la corrección del mismo (D').

A) Chiriguanos

Haplótipo DRBI-C	x	p	q	D	X ²	P	D'
0402-0702	0.040	0.176	0.068	0.028	8.355	0.004	0.412
0402-02021	0.010	0.150	0.010	0.008	5.724	0.017	1.000
0301-0702	0.020	0.706	0.068	-0.028	4.438	0.035	-0.583
0301-03041	0.180	0.616	0.224	0.042	4.150	0.042	0.457
0302-0801	0.030	0.153	0.064	0.020	5.206	0.023	0.336
0501-0302	0.010	0.030	0.010	0.010	32.660	0.000	1.000
0501-02022	0.010	0.030	0.020	0.009	15.492	0.000	0.485
0201-0303	0.010	0.020	0.080	0.008	4.891	0.027	0.457
0201-0703	0.010	0.022	0.064	0.009	5.796	0.016	0.462
0602-0703	0.010	0.022	0.064	0.009	5.796	0.016	0.462
0602-1402	0.010	0.020	0.010	0.010	49.495	0.000	1.000
0303-0702	0.010	0.024	0.068	0.008	4.891	0.027	0.457
0303-1503	0.010	0.020	0.010	0.010	49.495	0.000	1.000

B) Wichis

Haplótipo DRBI-C	x	p	q	D	X ²	P	D'
0411-0303	0.156	0.229	0.297	0.088	6.732	0.009	0.584
0404-0102	0.063	0.104	0.144	0.048	6.542	0.011	0.605
1402-0401	0.125	0.207	0.198	0.084	8.669	0.003	0.573
0802-0703	0.063	0.128	0.125	0.047	5.878	0.015	0.429
1101-0702	0.031	0.032	0.031	0.030	32.000	0.000	1.000
1406-0501	0.031	0.097	0.031	0.028	9.978	0.002	1.000
09-0102	0.031	0.035	0.144	0.026	5.574	0.018	1.000
1409-0703	0.031	0.032	0.125	0.027	7.226	0.007	1.000

C) Caucásicos

Haplótipo DRBI-C	x	p	q	D	X ²	P	D'
0701-02022	0.023	0.235	0.017	0.019	4.605	0.032	1.000
1601-0702	0.045	0.125	0.100	0.033	4.940	0.026	0.421
0801-0802	0.023	0.096	0.033	0.020	6.149	0.013	0.463
0801-1502	0.023	0.096	0.033	0.020	6.149	0.013	0.463
0901-0303	0.023	0.040	0.050	0.021	9.977	0.002	0.467
1303-1701	0.023	0.061	0.033	0.021	9.977	0.002	0.467
1303-12042	0.023	0.059	0.017	0.022	21.488	0.000	1.000
0403-0102	0.000	0.059	0.017	-0.001	0.049	0.825*	-1.000
0301-1702	0.000	0.059	0.017	-0.001	0.024	0.877*	-1.000
1501-02021	0.000	0.118	0.017	-0.002	0.102	0.749*	-1.000
1303-0501	0.000	0.060	0.050	-0.003	0.153	0.695*	-1.000

Tabla 13: Desequilibrio de ligamiento DRB1/ DQB1-C en las poblaciones Mapuche (A), Chiriguanos (B) y caucásicos de Buenos Aires y suburbios (C). * P no significativo.

5.5- 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 HLA-C utilizando el programa Arlequín [60]. Las cuatro poblaciones fueron hayadas en equilibrio, satisfaciendo la ley de Hardy-Weinberg. De esta forma, fue posible postular que la frecuencia de individuos homocigotas en cada población es igual a la suma de los cuadrados de las frecuencias alélicas 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 (F_{obs}) y esperado (F_{esp}), así como para evaluar si existían diferencias significativas entre ambos se utilizó el programa Arlequín [60]. Para las poblaciones estudiadas aquí el estadístico de homocigosis no difiere significativamente del esperado en la neutralidad. Además, como estos índices dependen del número de alelos se calculó el cociente $F_{esp}/F_{mínimo}$ para poder comparar la homocigosis entre las poblaciones independizándose del número de alelos presentes en cada una de ellas (**Tabla 14**). Este cociente no presenta diferencias notorias entre las poblaciones indígenas, pero el observado en la población Caucásica es más elevado que el de estas últimas.

	Mapuches	Chiriguano	Wichis	Caucásicos
F_{obs}	0.109	0.163	0.188	0.256
F_{esp}	0.099	0.165	0.199	0.298
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
$F_{mínimo}$	0.038	0.059	0.125	0.048
Nº alelos	26	17	8	21
F_{esp}/F_{min}	2.605	2.780	1.592	6.210

Tabla 14: Índices de homocigosis observado, esperado en condiciones de neutralidad y mínimo (1/Nº de alelos), para las distintas poblaciones estudiadas. El cociente F_{esp}/F_{min} es el índice de homocigosis relativo al mínimo teórico de homocigosis para este locus en cada población. n.s.: diferencia entre F_{obs} y F_{esp} no significativa.

5.6- Análisis filogenéticos

Los fenogramas fueron construidos utilizando las frecuencias alélicas del locus HLA-C. Fueron incluidas en el análisis veintiún poblaciones de distintos grupos étnicos y regiones geográficas: cuatro poblaciones amerindias (argentinas: Mapuches(1), Chiriguanos(1), Mataco-Wichis(1) y de Brasil-Colombia: Ticuna(1)); diez poblaciones caucásicas (Argentina(1), Italia(2), España(1), Alemania(1) [62], Inglaterra(1), Francia(1), Bélgica(1), Portugal(1) y Suiza(1)); cinco africanas (Argelia(1), Sudáfrica(1), Bubi de Guinea Ecuatorial(1) y Sudán(2)) y dos asiáticas (Corea(1) y Japón(1)). Las frecuencias génicas utilizadas en el análisis para los Mapuches, Chiriguanos, Wichis y Caucásicos de Buenos Aires corresponden a las obtenidas en el presente estudio. Para las demás poblaciones los datos de frecuencias del locus C corresponden a los reportados en la bibliografía [42, 62]. Las distancias utilizadas fueron las de Nei y las de Cavalli-Sforza. Para cada una de las distancias se obtuvieron dos fenogramas usando los métodos UPGMA y NJ, los mismos se muestran en las **Figuras 13-A** y **13-B** para las distancias de Cavalli-Sforza y en las **Figuras 14-A** y **14-B** para las de Nei. 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 la matriz de distancias, el bootstrap y para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el programa Phylip [64].

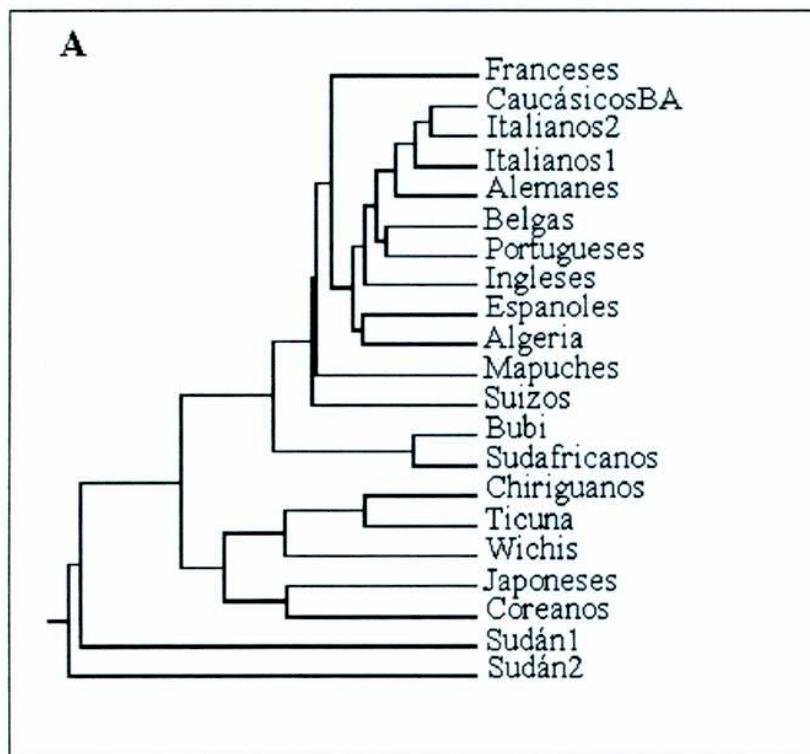
En el fenograma obtenido por el método de UPGMA (con distancias de Cavalli-Sforza) encontramos que las dos primeras divergencias separan poblaciones africanas del resto. Una segunda divergencia da lugar a dos grupos bien definidos, uno conteniendo a los amerindios (excepción los Mapuches) y asiáticos, y otro a los caucásicos (junto con el resto de poblaciones africanas y los Mapuches). Dentro del grupo de los amerindios y asiáticos, los Chiriguanos, Ticuna y Wichis se encuentran agrupados entre sí, y a su vez con un grupo constituido por Japoneses y Coreanos. Para esta agrupación se encuentra un valor de bootstrap muy alto, 98 %. Esto estaría evidenciando que realmente existen semejanzas entre los asiáticos y los indígenas de América.

Por otra parte, los caucásicos están formando parte de un grupo en donde las poblaciones más

semejantes parecen ser la de italianos con la de argentinos de Buenos Aires, las de Bélgica y Portugal y las de España y Argelia (norte de África, no caucásicos). Los alemanes, ingleses, franceses y suizos se encuentran constituyendo ramas independientes. La semejanza observada entre las poblaciones recién mencionadas y los Mapuches (los cuales se esperaría que estuvieran ubicados con el grupo que contiene a los amerindios) pueden parecer extrañas. Este grupo se observa en el 73 % de los bootstrap. Luego divergen las restantes poblaciones africanas.

Con el método de NJ (con distancias de Cavalli-Sforza) se obtiene un fenograma con muchas características similares al obtenido por UPGMA. Debe recordarse que con NJ se obtiene un árbol sin raíz y la misma puede encontrarse en cualquier parte. En este árbol se sigue manteniendo claramente el grupo de amerindios y asiáticos, los Caucásicos de Buenos Aires si bien siguen presentando gran semejanza con los italianos, esta vez se encuentran cercanos a este grupo. Los Mapuches siguen encontrándose más cercanos a los africanos y caucásicos que a los amerindios.

Los fenogramas realizados con los métodos de UPGMA y NJ, pero usando las distancias de Nei, no presentan grandes diferencias con los antes mencionados.



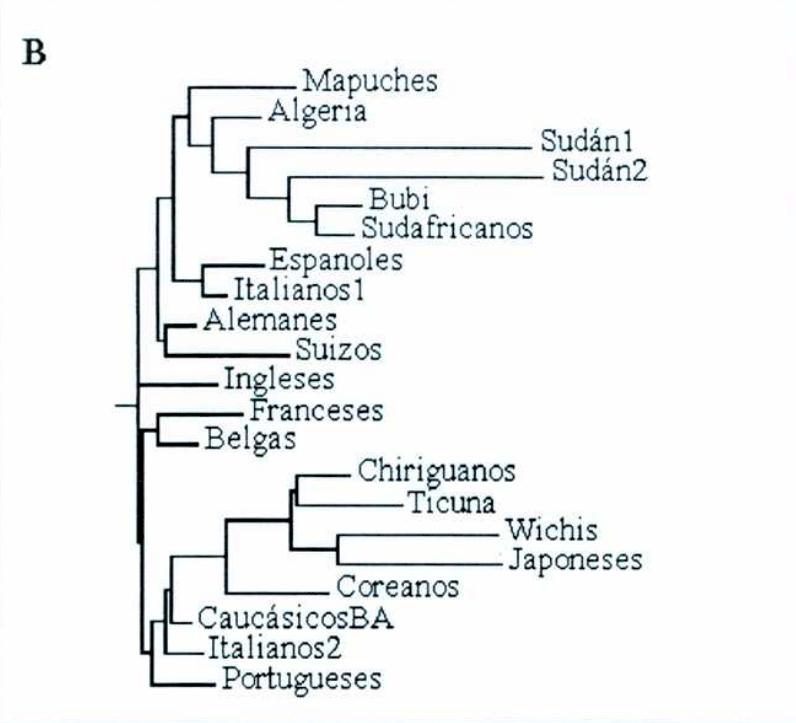
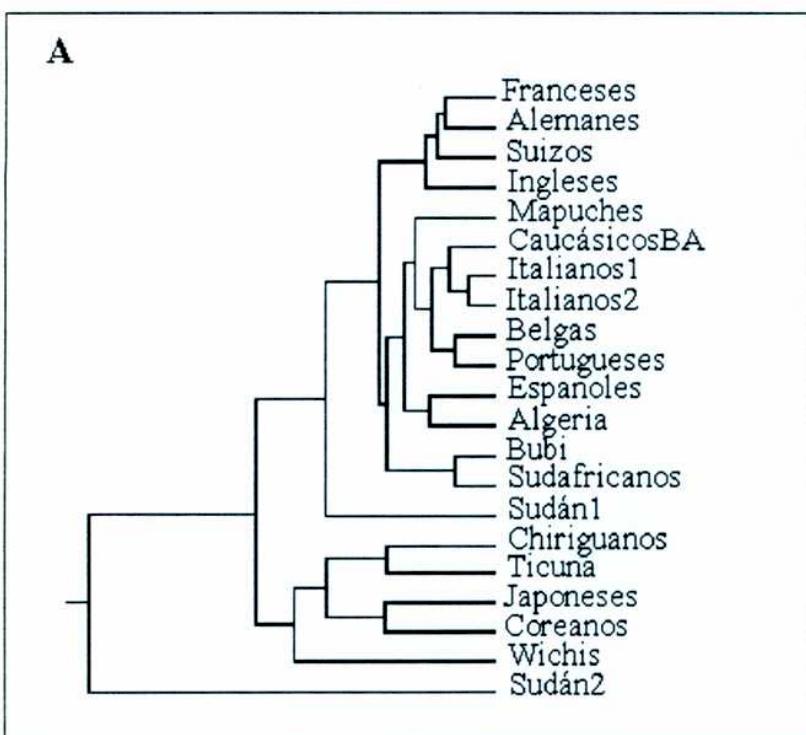


Figura 13: Fenogramas construidos por el método UPGMA (A) y el NJ (B), utilizando las distancias de Cavalli-Sforza. Se muestran las relaciones entre 21 grupos étnicos basándose en las frecuencias alélicas del locus HLA-C.



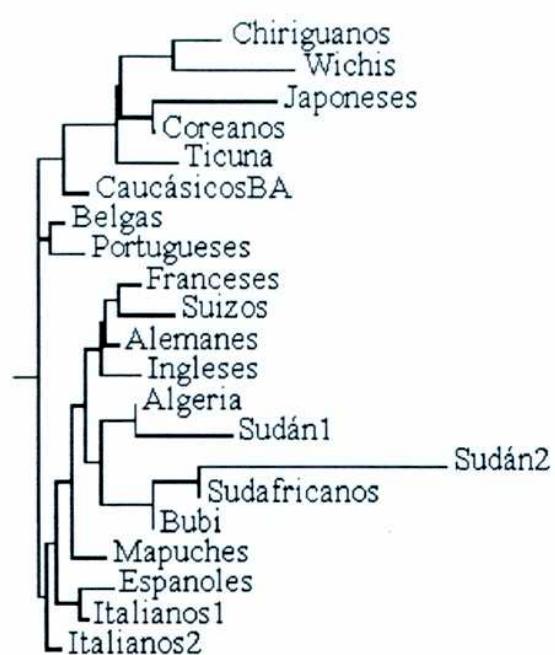
B

Figura 14: Fenogramas construidos por el método de UPGMA (A) y NJ (B), utilizando las distancias de Nei. Se utilizan los mismos grupos étnicos que en la **Fig. 13**.

6. Discusión

En cuanto a la comparación entre la tipificación serológica y por PCR-SSO, en los caucásicos la mayor parte de las discrepancias entre estas técnicas se debe a antígenos que no fueron detectados serológicamente (blanco → antígeno) y no a una tipificación serológica incorrecta (antígeno → antígeno). En el caso de las líneas celulares, el primer tipo de discrepancia no fue observada, ya que las 17 muestras fueron reportadas como serológicamente homocigotas (sin blancos). Sin embargo, 4 individuos resultaron ser heterocigotas, tres portando un alelo distinto al reportado por serología y uno resultó tener sus dos alelos distintos (14,7% de discrepancias del segundo tipo). Esta última línea celular fue asignada por serología como Cw2/Cw2, encontrándose por PCR-SSO que su tipificación era Cw*1701/Cw*1702. Esto no es sorprendente ya que los alelos Cw*1701 y *1702 fueron descriptos a partir de individuos con especificidad serológica Cw2, y fue postulado que un aminoácido localizado en la estructura α -hélice del dominio α_2 es compartido por los productos de Cw*02, Cw*1702 y Cw*1701, y es el responsable de la reactividad cruzada entre Cw17 y Cw2 [65, 66].

La comparación entre estas técnicas revela las dificultades metodológicas de la tipificación serológica del locus HLA-C y resalta la importancia de una tipificación por métodos moleculares. Esto último puede cobrar aún más relevancia si consideramos el papel crítico de HLA-C como regulador de la activación de las células NK [67], lo cual no deja dudas de que el polimorfismo en este locus tiene implicancias clínicas en transplantología, así como en ciertas enfermedades asociadas al HLA [68, 69]. Se ha demostrado que la disparidad en HLA-C se asocia con mayor incidencia y peor grado de reacciones de injerto versus huesped luego de un trasplante de médula ósea [70, 71].

En el presente estudio se describe por primera vez la distribución de frecuencias del locus HLA-C en una población de Buenos Aires y suburbios, así como en tres poblaciones indígenas argentinas.

En la población Caucásica de Buenos Aires y suburbios se encontraron 21 alelos diferentes para el locus HLA-C siendo los predominantes el Cw*0401 y el Cw*0701, seguidos por el Cw*0702, el *1203 y el *12021. La distribución de alelos predominantes en esta población es muy similar al encontrado en poblaciones caucásicas en general, excepto para el alelo Cw*12021 (frecuencia alélica=8.33%), el cual se encuentra ausente o en baja frecuencia en

dichas poblaciones. Sin embargo, se observa con frecuencias similares en algunas poblaciones asiáticas. Esta distribución de frecuencias alélicas, a su vez, es particularmente semejante a la de los italianos, lo cual no es extraño si se considera que los individuos que constituyen la población de Buenos Aires poseen ancestros españoles, italianos o criollos. Esta semejanza es visible en los árboles filogenéticos construidos a partir del locus C donde los argentinos y los italianos se agrupan juntos. Entre los alelos encontrados en esta población se observa en baja frecuencia el Cw*0303, el cual es un alelo predominante de poblaciones amerindias y raras veces se encuentra en poblaciones caucásicas, esto también correlaciona con lo visto en los fenogramas construidos con el método NJ donde la población de Buenos Aires se acerca al grupo de amerindios y asiáticos. Eran de esperar efectos parecidos a los descriptos si tenemos en cuenta que la población de Buenos Aires posee una gran proporción de mezcla, no sólo generada por varias migraciones europeas sino también por migraciones internas. La composición de la misma observada en el censo de 1947 [72] muestra que Buenos Aires se encontraba habitada fundamentalmente por una población de origen mediterráneo (Italianos y Españoles). Sin embargo con la industrialización ocurrida en el primer gobierno peronista, se produjo una migración principalmente del Norte y Noroeste Argentino (Santiago del Estero, Tucumán, Corrientes, Formosa, Salta y Jujuy). Esta población tiene un ascendiente importante de origen Guaraní (Corrientes, Formosa), y Toba (Chaco, Salta y Jujuy).

En las poblaciones de individuos Chiriguano y Wichis estudiadas se observó una disminución en la diversidad alélica, que si bien no fue tan marcada para los Chiriguanos, donde se encontraron 16 alelos, resultó significativamente reducida a 7 alelos en la población Wichi. Podría pensarse que esta reducción en el polimorfismo HLA es un artificio, resultado de un tamaño de muestra pequeño; sin embargo otros estudios hechos para los loci DRB1 y DPB1 (los cuales son aún más polimórficos que el locus HLA-C) en esta población pero con un mayor número de individuos, también revelan esta restricción tan marcada en el número de alelos [73, 33]. 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. Si bien el análisis de esta población fue realizado en una muestra pequeña, sus resultados constituyen un aporte al conocimiento de los fenómenos que se desarrollan en la misma. La distribución de frecuencias alélicas vista en los Chiriguanos y

Wichis concuerda con la observada en otras poblaciones amerindias, mostrando ambas el alelo Cw*0303 el cual es encontrado en la mayoría de estas poblaciones y en asiáticas, pero prácticamente no se detecta en las caucásicas. Además, los Chiriguanos presentan dos alelos, el Cw*0803 y el Cw*1503, que son exclusivos de poblaciones amerindias. También es posible notar que gran parte de los alelos observados en los Chiriguanos y Wichis son compartidos con los asiáticos, la semejanza entre estas poblaciones puede evidenciarse en los árboles filogenéticos.

La teoría del origen de la población humana de América esta de acuerdo con esto último. En comparación con otros continentes, América fue colonizada hace relativamente poco tiempo (10.000 a 40.000 años) por un número pequeño de migraciones provenientes de Asia a través del estrecho de Bering, donde se cree que se produjo el primer asentamiento (Paleo-Indios). Los descendientes de estos fundadores luego se expandieron hacia el norte y sur de América, donde se mantuvieron relativamente aislados hasta la llegada de inmigrantes europeos. Evidencias arqueológicas, lingüísticas y genéticas sugieren que ocurrieron por lo menos tres migraciones [74]. El estudio de las poblaciones amerindias modernas reveló algunas claves en la evolución del polimorfismo HLA. Se encontró que las mismas presentan una restricción en el número de alelos HLA, lo cual también se observa en estudios de marcadores de ADN mitocondrial y del cromosoma Y [75, 76]. Además los alelos encontrados en las poblaciones amerindias son compartidos con las poblaciones asiáticas, por lo que estos alelos deben haber estado presentes en las poblaciones fundadoras (alelos fundadores). Sin embargo, hay notables diferencias entre las poblaciones amerindias del Norte y sur de América. Centrándonos en los loci de clase I, puede verse que en las poblaciones amerindias del norte todos los alelos son idénticos a los alelos fundadores, en contraste, las poblaciones amerindias del sur poseen muchos alelos "nuevos" que derivan de los alelos fundadores por mutaciones puntuales o conversión interalélica. Una característica marcada en las poblaciones amerindias del sur es el gran número de alelos HLA-B generados por conversión. Para el locus HLA-A estas poblaciones presentan un pequeño número de alelos por conversión y para el locus HLA -C se observan unos pocos alelos "nuevos" producidos por mutaciones puntuales. Además se ha observado que para el locus HLA-B la aparición de alelos nuevos está acompañada por la pérdida de alelos fundadores, ha este fenómeno se lo ha de nominado recambio (turnover) de alelos.

En la **Fig. 15** se muestra un mapa con la ruta que siguieron las migraciones que dieron origen a la población humana de América. Además se muestran los alelos HLA-A, HLA-B y HLA-

C que fueron encontrados en cuatro poblaciones amerindias del norte y seis del sur, y los presentes en una población fundadora hipotética proveniente del noreste de Asia. También se incluyen los alelos del locus HLA-C encontrados en el presente trabajo para los Chiriguanos y Wichis.

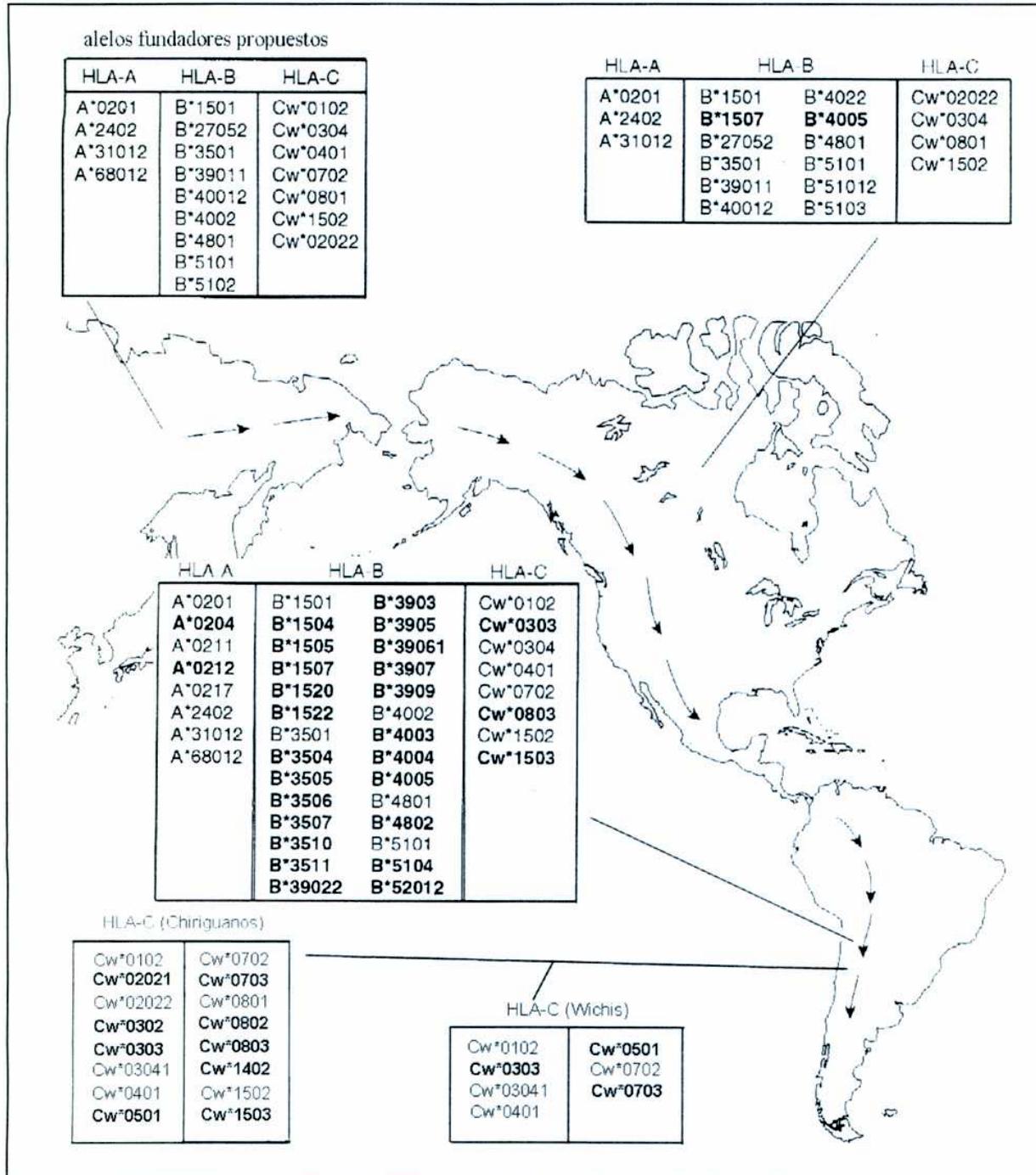


Figura 15: Mapa mostrando la ruta que siguieron las poblaciones del noreste asiático en la colonización de América. Los recuadros en el norte y sur de América muestran los alelos HLA-A,-B,-C que fueron detectados en cuatro poblaciones amerindias del norte y seis del sur, respectivamente. También se muestran los alelos HLA-C encontrados en los Chiriguanos y Wichis en el presente estudio. En negrita se muestran los alelos característicos de poblaciones americanas.

En cuanto a la restricción del número de alelos que presentan las poblaciones amerindias, esta 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. Si bien estas explicaciones no son mutuamente excluyentes, el hecho de que los alelos que faltan en las poblaciones de Wichis y Chiriguanos (Cw*0403, *12042, *1702) también estén ausentes en otros grupos amerindios estudiados, sugiere que la explicación para este fenómeno serían los cuellos de botella producidos durante la colonización, más que la deriva génica actuando individualmente en las poblaciones aisladas. Tampoco hay que descartar enfermedades masivas o factores ambientales donde la selección direccional pudiera actuar en favor de ciertos alelos.

En los Mapuches encontramos varias características que no son propias de las poblaciones amerindias. Se observa que el alelo predominante es el Cw*0702, seguido por el Cw*0401 y el Cw*0701, esta distribución es característica de muchas poblaciones caucásicas y también de algunas africanas (ej: Argelia). Esta semejanza no esperada entre los Mapuches y estas poblaciones también se revela en los fenogramas construidos. Además, el número de alelos encontrado en esta población (25) no refleja una restricción tan marcada en la variabilidad alélica, vista en poblaciones amerindias. Por otro lado, la característica que sí comparte con las poblaciones amerindias, y por ende con los Chiriguanos y Wichis aquí estudiados, es que entre sus alelos contiene a los de la población fundadora hipotética (del noreste asiático), y además posee el alelo Cw*0803 (encontrado en los Chiriguanos), el cual es observado únicamente en poblaciones amerindias. Una explicación posible para los fenómenos ocurridos en esta población es que si bien fue originada por las migraciones del noreste asiático, la misma ha tenido una fuerte influencia de la colonización europea. Estudios realizados para otros marcadores genéticos sobre la misma población, revelan cierta mezcla, producto de la existencia de flujo génico desde poblaciones caucasoides [77, 78]. La diversidad en la organización social de las diferentes tribus y la gran influencia que la colonización europea tiene sobre la estructura de estas poblaciones, hace que ciertas tribus amerindias modernas tiendan a ser más similares a las caucásicas, presentando un número de alelos HLA de clase I mayor al visto para otras poblaciones amerindias [46]. Esto también fue observado por el grupo de Fernández-Viña [33] para una población Toba.

También se encontraron en la población Mapuche bajas frecuencias de los alelos Cw*0103, *02023, *0704 y *15051, los cuales no son observados en el resto de poblaciones analizadas en este estudio, pero sin embargo presentan frecuencias algo mayores en otras poblaciones caucásicas, como por ejemplo en una del Reino Unido [41]. Por otro lado se encontró un alelo con un patrón de hibridación diferencial, el que debido a su semejanza con el Cw*0707 fue denominado Cw* 0707 variante (Cw*0707v).

En este trabajo se estudian por primera vez haplotipos DRB1-DQB1-C, y se realizan comparaciones con los haplotipos DRB1-DQB1 observados en otras poblaciones. El estudio de los haplotipos más frecuentes revela semejanzas entre los caucásicos de Buenos Aires con otras poblaciones caucásicas. El haplotipo DRB1*1101-DQB1*0301-Cw*12021 resultó ser el más frecuente en nuestra población caucásica como también en las poblaciones Caucásicas de Italia, teniendo en cuenta sólo DRB1-DQB1. También existen algunos aspectos dignos de destacar en nuestra población caucásica. En esta se encuentra el haplotipo DRB1*0403-DQB1*0302-Cw* 0701, el cual ha sido reportado como un haplotipo común de poblaciones amerindias. Por otro lado el alelo Cw*0303, tipicamente indígena, se encuentra formando parte de dos haplotipos, entre los cuales el DRB1*0901-DQB1*0303-Cw*0303 también ha sido reportado en poblaciones indígenas americanas. Cabe suponer que estos haplotipos son contribución indígena y podrían provenir del grupo que contiene a los amerindios que se encuentra próximo a los caucásicos de Buenos Aires en los fenogramas construidos por el método de NJ. El alto desequilibrio de ligamiento entre DRB1 y DQB1 hace que en el estudio de haplotipos siempre aparezca la misma combinación de estos dos loci, es decir, un determinado alelo DRB1 se encuentra asociado a un determinado DQB1. Pero estas mismas combinaciones se encuentran con varios alelos (los más frecuentes) del locus HLA-C.

En los Chiriguanos y Wichis se encuentra una reducida cantidad de haplotipos, lo cual es consecuencia de la restricción en el número de los alelos de los distintos loci HLA. Algunos haplotipos son compartidos por ambas poblaciones, pero ninguno se encuentra en la población caucásica. El haplotipo DPB1*1402-DQB1* 0301-Cw*0401 presenta alta frecuencia en ambas poblaciones indígenas. La mayoría de las combinaciones DRB1-DQB1 que componen los haplotipos descriptos en estas poblaciones fueron encontrados previamente en varias poblaciones amerindias de México, Brasil, Colombia y Venezuela. Sin embargo, el

haplotipo DRB1*0701-DQB1*0201-Cw*0401 encontrado en alta frecuencia en nuestros caucásicos (y en otras poblaciones caucásicas), es observado en los Wichis y Chiriguanos pero con el alelo Cw*0303, a pesar de que el alelo Cw*0401 es un alelo frecuente en estas poblaciones. Esto puede deberse a posibles ventajas selectivas o a que no ha pasado suficiente tiempo como para evidenciar el efecto de la recombinación genética.

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. Se han observado haplotipos HLA-B-DRB1 con fuertes desequilibrios de ligamiento, a pesar de que la distancia que separa estos loci es relativamente grande (1250kb). Por otro lado, fuertes desequilibrios de ligamiento fueron reportados entre HLA-C y HLA-B en poblaciones caucásicas y japonesas [79]. Estos motivos nos impulsaron a estudiar el desequilibrio de ligamiento entre el locus HLA-C y los loci de clase II, lo cual no había sido hecho hasta el momento. También nos hubiese gustado contar con la tipificación de los loci HLA-A y HLA-B para incluirla en el análisis, pero esto no fue posible al momento de finalización de este trabajo.

En la población de Wichis se observó desequilibrio de ligamiento significativo entre HLA-C y DRB1, mientras en la de Chiriguanos entre HLA-C y DQB1. Entre las causas posibles de este desequilibrio de ligamiento observado se pueden mencionar las posibles ventajas selectivas y la proximidad entre los genes. Sin embargo no debe descartarse la posibilidad de un incorrecto muestreo, en el que el panel de individuos analizados tenga relación de parentezco y la mezcla, producto del flujo génico entre diversas poblaciones. Descartando problemas de muestreo tales como relaciones de parentezco entre individuos o mezcla génica entre poblaciones, proponemos que el desequilibrio de ligamiento observado entre HLA-C y DRB1 o DQB1 podría ser reflejo de su ventaja selectiva. En este sentido, se cree que el mantenimiento del desequilibrio de ligamiento entre alelos de los loci de clase I y clase II puede ser el resultado de respuestas sinérgicas ventajosas entre las células T CD8 y CD4 a péptidos de determinados parásitos, los cuales están restingidos por los alelos del mismo haplotipo [33].

En la población de caucásicos de Buenos Aires, no se encontró desequilibrio de ligamiento

significativo entre HLA-C y DQB1, ni tampoco entre HLA-C y DRB1 (a pesar de que algunas combinaciones mostradas poseen índices de desequilibrio de ligamiento significativos). Esto resulta raro si consideramos que nuestra población caucásica es, prácticamente, una mezcla de inmigrantes que ingresaron a nuestro país a partir del siglo XVI. Sin embargo, no deja dudas de que la mezcla (por flujo génico) no es el mecanismo causante del desequilibrio de ligamiento visto en las poblaciones indígenas analizadas en este estudio.

Existen varias pautas de selección equilibradora actuando sobre un gen, muchos de los cuales se confirman para DRB1 y DQB1: distribución de frecuencias donde los alelos poseen frecuencias similares, alta persistencia de los linajes alélicos a través de los sucesivos eventos de especiación (hipótesis trans-específica), índices de homocigosis desviados de lo esperado en neutralidad, desequilibrio de ligamiento, relaciones entre tasas de sustitución no sinónimas a sinónimas (dN/dS) mayores que uno. Con el fin de esclarecer los posibles mecanismos que actúan para mantener el polimorfismo del locus HLA-C (estudiados en otros loci HLA) y debido a que no era posible efectuar el análisis de la tasa de sustituciones, ya que nosotros no secuenciamos alelos y sólo detectamos diferencias no sinónimas entre los mismos, realizamos el test de neutralidad de Ewens-Watterson. Al obtener índices de homocigosis para el locus HLA-C de cada población observamos que los mismos no se alejaban significativamente de los esperados en condición de neutralidad selectiva. Lo cual, sumado a una distribución de frecuencias alélicas en la cual predominan algunos alelos mientras que otros están presentes en frecuencias muy bajas (claramente se observa en los Chiriguanos y Mapuches), y al bajo coeficiente de selección y una menor tasa dN/dS con el respecto al resto de los loci HLA, podría estar evidenciando que el típico mecanismo de selección operando sobre los demás loci HLA no estaría actuando sobre el locus HLA-C en estas poblaciones. Sin embargo, los resultados variables obtenidos para el desequilibrio de ligamiento entre HLA-C y DRB1 o DQB1, y el fuerte desequilibrio observado entre HLA-C y HLA-B, ponen en duda la ausencia de selección actuando sobre el locus HLA-C.

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 (**Fig. 16**). La segunda fisión separó a los australianos y asiáticos del sudeste de los eurasiáticos, que en una tercera etapa de divergencia dieron lugar a los caucásicos por un lado y a los asiáticos del no norte y amerindios por el otro [80, 81, 82]. 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, pero nunca ha sido utilizado el locus HLA-C para reconstruir la filogenia humana.

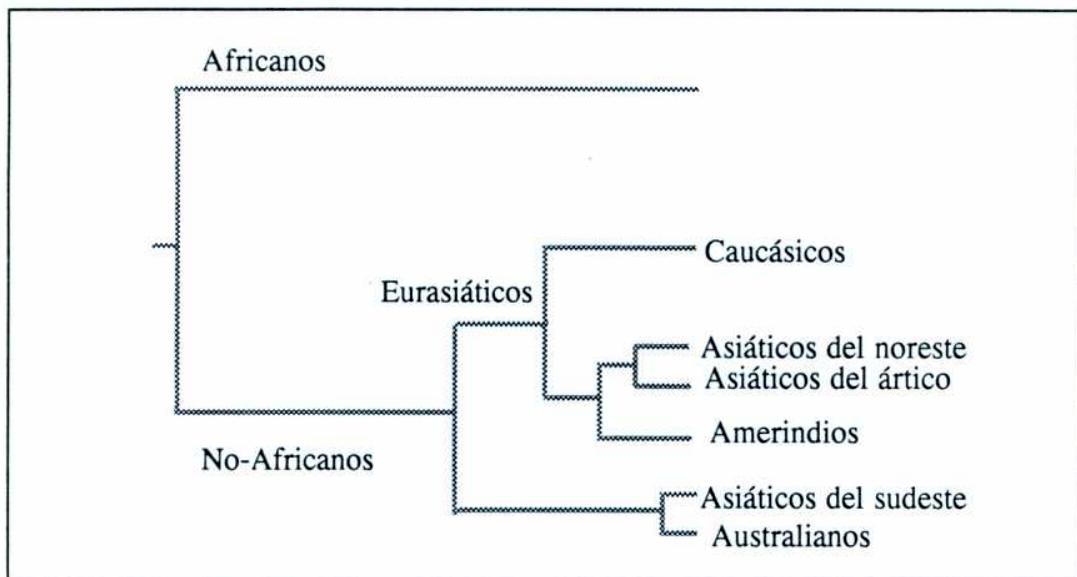


Figura 16: Reconstrucción de la filogenia humana.

Si bien los fenogramas obtenidos no se ajustan perfectamente con este esquema esto puede deberse a que en algunas 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 y a que algunas de las poblaciones que vemos actualmente pueden estar altamente influenciadas por la mezcla, producto del flujo génico entre poblaciones. Por otro lado, no se contaba con poblaciones del sudeste asiático ni de australia para incluir en el análisis.

Sin embargo, hay muchos aspectos de este análisis que coinciden con lo esperado. En los fenogramas construidos con el método UPGMA, se puede ver una primera divergencia entre algunas poblaciones africanas y el resto, al cual podemos denominar el grupo de los euroasiáticos (excluyendo al resto de poblaciones africanas). Dentro de este agrupamiento podemos ver a su vez dos grupos bien definidos: el de los amerindios (excepto los Mapuches) y poblaciones del noreste asiático, y el de los caucásicos. El primer grupo mencionado se

encuentra constituyendo un grupo bien definido y divergente del segundo en todos los árboles. El grupo de los caucásicos extrañamente contiene a los Mapuches, y a las poblaciones africanas de Argelia, Bubi de Guinea Ecuatorial y Sudáfrica. Estas poblaciones africanas son un claro ejemplo de poblaciones con un gran número de alelos no detectados, probable razón por la cual estas poblaciones se agrupan con las caucásicas. Tampoco habría que descartar la posible mezcla que puede existir por ejemplo entre la población de Argelia y España (países relativamente cercanos geográficamente), a las cuales se las observa agrupadas en algunos árboles. Por otro lado, los Mapuches constituyen un ejemplo de poblaciones con gran proporción de mezcla. Esto también puede evidenciarse en parte en un estudio hecho sobre el sistema ABO en tribus indígenas argentinas donde se obtuvieron fenogramas que permiten observar que los Mapuches divergen antes que los demás indígenas argentinos [83].

Como conclusiones 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 C principalmente. En los Wichis y Chiriguano s encontramos una reducción en la diversidad alélica del locus HLA-C, ambas poblaciones presentan alelos tipicamente amerindios y comparten el resto de sus alelos con poblaciones del noreste asiático. Los mapuches presentan varias características que no son propias de poblaciones amerindias. Una distribución de alelos predominantes similar a la descripta en caucásicos y algunas poblaciones africanas, y una no tan marcada restricción en la variabilidad alélica, revelan cierta mezcla producto del flujo génico entre poblaciones. En el análisis de haplotipos se observa que cada combinación DRB1-DQB1 aparece con varios alelos (los más frecuentes) del locus C. El desequilibrio de ligamiento observado en los Wichis y Chiriguano s podría ser reflejo de su ventaja selectiva. No se encontraron asociaciones DRB1/DQB1-C en los caucásicos. Las fuerzas selectivas actuando sobre el locus HLA-C 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 el locus HLA-C es mas bien neutro a nivel de selección. En la historia evolutiva del locus HLA-C quedan algunos puntos por aclarar que no encuadran en este esquema de neutralidad selectiva. Los estudios filogenéticos revelan un grupo interesante de amerindios (excepto los Mapuches) y poblaciones del noreste asiático, divergente del resto.

7. Bibliografía

1. Townsend, A. Antigen recognition by class I restricted T lymphocytes. *Annual Review of Immunology* 7: 601, 1989.
2. Steimle, V. Regulation of MHC class II expression by IFNgama mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 256: 106, 1994.
3. Bjorkman, P. J. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506, 1987.
4. Garrett, T. P. J. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342: 692, 1989.
5. Madden, D. R. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggest a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70: 1035, 1992.
6. Brown, J. H. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33, 1993.
7. Falk, K. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351: 290, 1991.
8. Falk, K. Allele-specific peptide ligand motifs of HLA-C molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 12005, 1993.
9. 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.
10. Sidney, J. Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs. *Immunology Today* 17: 261, 1996.
11. Sidney, J. Several HLA alleles share overlapping peptide specificities. *The Journal of Immunology* 154: 247, 1995.
12. Campbell, R. D. Map of the human MHC. *Immunology Today* 14: 349, 1995.
13. Wei, X. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Human Immunology* 29: 131, 1990.
14. Moretta, A. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annual Review of Immunology* 14: 619, 1996.
15. Cresswell, P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha:\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82: 155, 1995.
16. Monaco, J. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368: 551, 1994.
17. Bodmer, J. G. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigen* 49 : 297, 1997.

18. HLA class I region sequences, 1998. *Tissue Antigens* 51: 417, 1998.
19. HLA class II region sequences, 1998. *Tissue Antigens* 51: 467, 1998.
20. Brodsky, F. M. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annual Review of Immunology* 9: 707, 1991.
21. Brodsky, F. M. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 47: 464 , 1996.
22. Gaczynska, M. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365: 264, 1993.
23. Klein, J. Origen of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Human Immunology* 19: 155, 1987.
24. Parham, P. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272: 67, 1996.
25. Parham, P. The origins of HLA-ABC polymorphism. *Immunological Reviews* 143: 141, 1995.
26. Andersson, L. Generation of MHC class II diversity by intra and intergenic recombination. *Immunological Reviews* 143: 5, 1995.
27. Andersson, L. Concerted evolution in a segment of the first domain of polymorphic MHC class II B loci. *Immunogenetics* 33: 235, 1991.
28. Grundschober, G. Sequence of four new HLA-Cw alleles: a possible role of interallelic recombination. *Tissue Antigens* 51: 72, 1998.
29. Satta, Y. Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 91: 7184 , 1994.
30. Hedrick, P. W. Evolutionary genetics of the Major Histocompatibility Complex. *The American Naturalist* 143: 945, 1994.
31. Klein, J. The molecular descent of the Major Histocompatibility Complex. *Annual Review of Immunology* 11: 269, 1993.
32. Potts, W. K. Pathogen based models favoring MHC genetic diversity. *Immunological Reviews* 143: 181, 1995.
33. Fernández-Viña, M. A. Dissimilar evolution of B-locus versus A-locus and class II loci of the HLA region in South American Indian tribes. *Tissue Antigens* 50: 233, 1997.
34. Begovich, A. B. Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *The Journal of Immunology* 148: 249, 1992.
35. Levine, J. E. SSOP typing of the Tenth International Histocompatibility Workshop reference cell lines for HLA-C alleles. *Tissue Antigens* 44: 174, 1994.

36. Kennedy, L. J. Definition of HLA-C alleles using sequences specific oligo nucleotide probes (PCR-SSOP). *Tissue Antigens* 46: 187, 1995.
37. Piazza, A. HLA in Europe and in the Mediterranean countries. HLA. Proceedings of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference. France. EDK, vol 1: 374, 1997.
38. Petzl-Erler. Anthropology report for Region Latin-America: Amerindian and admixed populations. HLA. Proceeding of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference. France. EDK, vol 1: 337, 1997.
39. Tomsen, M. Localization of the recombination points in a family with two DR/DP recombinations. *Tissue Antigen* 47: 492, 1996.
40. Gregersen, P. K. Recombination sites in the HLA class II region are haplotype dependent. *The Journal of Immunology* 141: 1365, 1988.
41. Bunce, M. High resolution HLA-C typing by PCR-SSP: identification of allelic frequencies and linkage disequilibria in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology. *Tissue Antigens* 50: 100, 1997.
42. Bodmer, J. Anthropology report Introduction. HLA. Proceeding of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference. France. EDK, vol 1: 269, 1997.
43. Wells, R. S. Cw*1701 defines a divergent african HLA-C allelic lineage. *Immunogenetics* 46: 173, 1997.
44. The complete primary structure of Cw*1701 reveals a highly divergent HLA class I molecule. *Tissue Antigens* 49: 267, 1997.
45. Gao, X. Diversity in HLA-DR4-related DR, DQ haplotypes in Australia, Oceania and China. *Human Immunology* 32: 269, 1991.
46. Parham, P. Episodic evolution and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americas. *Tissue Antigens* 50: 219, 1997.
47. Takiguchi, M. The structure and expression of genes encoding serologically undetected HLA-C locus antigens. *The Journal of Immunology* 143: 1372, 1989.
48. Hajek-Rosenmayr, R. HLA-C "blank" alleles express class I gene products. Biochemical analysis of four different HLA-C blank polypeptides. *Immunogenetics* 30: 399, 1989.
49. Mytilineos, J. Comparison of typing results by serology and polymerase chain reaction with sequence-specific primers for HLA-Cw in 650 individuals. *Tissue Antigens* 50: 395, 1997.

50. Tatari, Z. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A. 92: 8803, 1995.
51. Bunce, M. Rapid DNA typing for HLA-C using sequence-specific primers (PCR-SSP): identification of serological and non serologically defined alleles including several new alleles. *Tissue Antigens* 43: 7, 1994.
52. Bunce, M. Improvements in HLA-C typing using sequence-specific primers (PCR-SSP) including the definition of HLA-Cw9 and Cw10 and a new allele HLA-Cw7/8v. *Tissue Antigens* 44: 200, 1994.
53. Wang, H. Identification of HLA-C alleles using PCR-single-strand-conformation polymorphism and direct sequencing. *Tissue Antigens* 49: 134, 1997.
54. Prober, J. M. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336, 1987.
55. Argüelo, J. R. High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA). *Tissue Antigens* 52: 57, 1998.
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. Hispamérica Ed., 1986.
58. Cereb, M. Locus-specific amplification of HLA class I genes from genomic DNA: locus specific sequences in the first and third introns of HLA-A, -B, -C alleles. *Tissue Antigens* 45: 1, 1995.
59. Miller, S. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215, 1988.
60. Schneider, S. Arlequin: a software package for population genetics. Genetics and Biometry. Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, 1996.
61. Lewontin, R. C. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120: 849, 1988.
62. Ferencik, S. Caucasian German Normal. Terasaki, P. I. *HLA* 1997: 222, 1997.
63. Wen-Hsiung Li Dan Graur. *Molecular Evolution*. Chapter five, 1991.
64. Felsenstein, J. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package)*. University of Washington, 1995.
65. Cereb, N. Cw*1701, a new HLA-C allelic lineage with an unusual transmembrane domain. *Tissue Antigens* 49: 252, 1997.
66. Wang, H. A novel allele, Cw*1702 with serological Cw2 specificity. *Tissue Antigens* 49: 183, 1997.

67. Lanier, L. L. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells. *Immunology Today* 17: 86, 1996.
68. D'Amaro, J. HLA-C associations with acute leukemia. *Lancet* 2: 1176, 1984.
69. Green, J. Investigations of the associations of a number of HLA antigens with psoriasis and psoriatic arthritis. *Stat. Med.* 7: 443, 1988.
70. Petersdorf, E. W. Molecular diversity of the HLA-C locus in unrelated marrow transplantation. *Tissue Antigens* 44: 93, 1994.
71. Tatari, Z. Influence of donor/recipient HLA-C disparity in 110 unrelated bone marrow transplantation. *Human Immunology* 47: 80, 1996.
72. IV Censo General de la Nación, ed. M.d.A.T. Presidencia de la Nación. Vol. I. 1947, Buenos Aires, Argentina: Dirección Nacional del Servicio de Estadística.
73. Vullo, C. HLA polymorphism in Mataco South American Indian tribe: serology of Class I and II antigens. Molecular analysis of class II polymorphic variants. *Human Immunology* 35: 209, 1992.
74. Cavalli-Sforza, L. L. *The history and Geography of Human Genes*, ed.P.U.Press. 1994, Princeton, New Jersey.
75. Bortolini, M. C. Genetic variability in two Brazilian ethnic groups: a comparison of mitochondrial and protein data. *Am. J. Phys. Anthropol.* 103: 147, 1997.
76. Rodriguez-Delfín, L. Diversity of the human Y chromosome of South American Amerindians: a comparison with blacks, whites, and Japanese from Brazil. *Ann. Hum. Genet.* 61: 439, 1997.
77. Carnese, F. R. Grupos sanguíneos en una población mapuche de Blancura Centro, provincia de Río Negro, Argentina. *Bol. Soc. Esp. Antrop. Biol* 14: 31, 1993.
78. Carnese, F. R. Demography and blood genetics of argentinian mapuche indians. *International Journal of Anthropology*, 1994.
79. Ando, H. HLA-C genotyping in the Japanese population by the PCR-SSP method. *Tissue Antigens* 48: 55, 1996.
80. 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.
81. 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.

82. Bailliet, G. Founder mitochondrial haplotypes in amerindian populations. American Journal of Human Genetics 54: 27, 1994.
83. Carnese, F. R. Distancias genéticas en poblaciones aborígenes de la Argentina. X Congreso Latinoamericano de Genética. Río de Janeiro, 1992.