

Tesis de Posgrado

Estudio molecular de la distribución de alelos HLA-DR-DQ en poblaciones normales argentinas y en pacientes con hepatitis crónica autoinmune

Pando, Marcelo

1998

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Pando, Marcelo. (1998). Estudio molecular de la distribución de alelos HLA-DR-DQ en poblaciones normales argentinas y en pacientes con hepatitis crónica autoinmune. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3093_Pando.pdf

Cita tipo Chicago:

Pando, Marcelo. "Estudio molecular de la distribución de alelos HLA-DR-DQ en poblaciones normales argentinas y en pacientes con hepatitis crónica autoinmune". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3093_Pando.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Estudio molecular de la distribución de alelos HLA-DR-DQ
en poblaciones normales argentinas y en pacientes con
hepatitis crónica autoinmune

MARCELO PANDO

DIRECTORES: Dr. MARCOS LEONARDO SATZ

Dr. LEONARDO FAINBOIM

Laboratorio de Inmunogenética,
Hopital de Clínicas "José de San Martín"

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

1998

3093

**A mis padres y a mi
familia**

A Leito y Bibi

Agradecimientos:

A Leito, que con su entusiasmo y el placer que le proporcionaba la investigación, la docencia y el tango, estimuló mi interés por la inmunología y por otras cosas mas.

A Bibi, por toda la alegría y buena onda que repartió por el laboratorio.

A Leo Fainboim, quien me ayudó mucho en este último tramo.

A mis padres y a la gran familia, que están cuando se los necesita.

A Vali y a mis amigos que de una u otra forma la parieron conmigo.

A Moni, Gabi, Nancy, Juli, Livio y todos los que pasaron por HLA, con los que compartí muchos momentos de alegrías y tristezas, entusiasmos y decepciones, congresos y bailes, workshops y squash, aunque lo mejor era saber que estaban allí cada mañana.

A Yoli y Nely que nos mantienen despiertos durante todo el día.

A mis vecinas de DNA Grace, Ale y Andrea con las que siempre puedo contar.

A Vero y todas las demás personas que me ayudaron en la corrección.

A todos mis compañeros del lab con quienes disfruté muy lindos momentos.

INTRODUCCION	5
El Complejo Mayor de Histocompatibilidad: estructura y función	5
Estructura	5
Moléculas de clase I	5
Moléculas de Clase II	8
Interacción del TCR con el complejo MHC-péptido	12
Función de las moléculas MHC	13
Organización genética del sistema HLA	14
Región de clase I	15
Región de clase II	16
Región de clase III	19
Estructura de los genes HLA	20
Regulación y expresión de las moléculas HLA de clase H	21
Presentación antigénica	23
Polimorfismo del sistema HLA	25
Evolución de los genes HLA de Clase H	26
Origen de los loci HLA de Clase II	26
Origen del polimorfismo de Clase II	29
HLA y enfermedad	31
Hepatitis autoinmune	33
Clasificación de las HAI	35
Aspectos clínicos, de laboratorio e histológicos de la HAI	36
Tratamiento	37
Inmunogenética	38
Teoría del disparo viral	41
OBJETIVOS	43

MATERIALES Y METODOS	44
Individuos sanos de la Ciudad de Buenos Aires y de Orán, Salta.	44
Panel Normal	44
Indios Chiriguanos y Wichi	45
Pacientes con HAI	45
Hepatitis Autoinmune	45
Tipificación de alelos de los loci HLA-DRB1, DRB3, DQA1 y DQB1 por oligonucleotidos específicos de secuencia (SSOP)	46
Oligotipificación de los loci HLA-DRB	47
HLA-DRB1	47
HLA-DRB3	49
Oligotipificación de HLA-DQA1 y HLA-DQB1.	49
Métodos de extracción de ADN	50
Fenol-cloroformo:	50
Micro método Salting-out:	52
Amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	53
Programas de PCR	53
Optimización de la reacción	53
Verificación del producto de PCR	54
Hibridación	54
Dot blot (siembra del ADN en puntos)	55
Marcación radioactiva de la sonda	56
Hibridación	57
Método con Cloruro de Tetrametilamonio (TMAC)	57
Método alternativo sin TMAC 3M	60
Método alternativo de hibridación utilizado los últimos años en nuestro laboratorio	61
Detección de las sondas hibidadas	61
Autorradiografía de sondas marcadas con ATP[γ P ³²]	61
Eliminación de la sonda para rehibridar la membrana	61
Controles	62
Controles para PCR	62
Controles para la hibridación	62

Tipificación del alelo HLA-A 11 por PCR-SSP	63
Análisis estadísticos	64
Estimación de Frecuencias	64
Desequilibrio de ligamiento	65
Equilibrio de Hardy-Weinberg	65
Distancias génicas	66
Arboles filogenéticos	66
Análisis multivariado	67
Medidas de asociación a enfermedad	69
Riesgo relativo y fracción etiológica	69
Estudio de la asociación de dos factores	71
Sondas	72
Sondas específicas para los loci DRB	72
Sondas usadas para la tipificación genérica de DRB1	74
Sondas usadas para la tipificación DR1	75
Sondas usadas para la tipificación de DR2 (DRB1)	76
Sondas usadas para la tipificación de DR4 (DRB1)	76
Sondas usadas para la tipificación del grupo asociado al DR52 (DRB1)	77
Sondas usadas para la tipificación del DRB3	81
Sondas específicas para el locus DQA1	82
Sondas usadas para la tipificación de DQA1	82
Sondas específicas para el locus DQB1	83
Sondas usadas para la tipificación de DQB1	84
RESULTADOS	86
Distribución de las frecuencias alélicas de los loci DRB1, DQA1, DQB1 y	
DRB3 en una población normal de Buenos Aires	86
Frecuencias de los antígenos DR	86
Frecuencias de los alelos del DRB1	88
Frecuencias de los alelos de los loci DQA1, DQB1 y DRB3	92
Haplotipos DRB1-DQA1-DQB1	95

Distribución de las frecuencias alélicas de los loci DRB1, DQA1 y DQB1 en dos poblaciones indígenas del noroeste de Argentina	100
Frecuencias de los antígenos DR	100
Subtipos alélicos del locus DRB1	101
Frecuencias alélicas de los loci DQA1 y DQB1	104
Haplotipos más frecuentes entre los loci DRB1-DQA1-DQB1	106
Análisis filogenético	107
Estudio de la asociación de HLA de Clase H en pacientes con HAI	117
Características generales de los pacientes con HAI-P y HAI-AD.	117
Análisis del locus DRB1 a nivel genérico	119
Análisis de los subtipos alélicos del locus DRB1	121
Estudio de los loci DQA1 y DQB1	125
Análisis del locus DRB3	130
Análisis de subgrupos definidos por los anticuerpos ASMA y ANA	131
Variaciones en la secuencia aminoacídica	132
Asociación de dos loci con HAI-AD	135
Distribución de frecuencias antigénicas de DR en pacientes con HAI en grupos de diferentes edades	137
DISCUSIÓN	139
Discusión del estudio genético de los loci DRB1, DQA1, DQB1 y DRB3 en tres poblaciones Argentinas	139
Discusión de los estudios sobre la asociación HLA a la Hepatitis Autoinmune	147
CONCLUSIONES	151
APENDICE	153
ACRONIMOS Y ABREVIATURAS	165
BIBLIOGRAFÍA	167

INTRODUCCION

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad: estructura y función

Las moléculas de histocompatibilidad son glicoproteínas polimórficas que se encuentran en la superficie celular. Las mismas están codificadas por múltiples loci que se ubican dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estos genes son de expresión codominante y en consecuencia, un individuo expresa varias de estas formas polimórficas simultáneamente en la membrana de sus células. La función principal que tienen estas moléculas es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T para generar algún tipo de respuesta inmune [1]. El MHC en el hombre se denomina “HLA” (*human leucocitarian antigen*).

Estructura

Las moléculas de histocompatibilidad son heterodímeros formados por dos cadenas, una alfa y otra beta. Existen dos tipos de moléculas: las de clase I y las de clase II.

Moléculas de clase I

Las moléculas de clase I presentan péptidos a los linfocitos T CD8, los que ejecutan una respuesta citotóxica. La cadena alfa con 340 aminoácidos (42-44 kd), tiene 3 dominios extracitoplasmáticos, uno transmembránico que la ancla a la membrana celular y una cola citoplasmática. La cadena beta de 99 aminoácidos (12 kd), se encuentra unida no covalentemente a la alfa, no está anclada a la membrana ni está codificada en el MHC y se la denomina β_2 microglobulina. Los dominios extracelulares de la cadena alfa, de aproximadamente 90 aminoácidos cada uno, están codificados por exones separados. Los

dominios más alejados de la membrana ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), que presentan cierta homología entre sí, forman lo que se denomina el surco de presentación antigénica, donde se ubica el péptido antigénico. El dominio $\alpha 3$ y la cadena β_2 microglobulina, son relativamente conservadas y poseen una gran similitud con los dominios constantes de las inmunoglobulinas.

Las moléculas de clase I fueron las primeras en ser purificadas, pudiendo, gracias a esto, determinarse la estructura por cristalografía de rayos X. El análisis cristalográfico de la estructura tridimensional de la molécula HLA-A2 muestra la posición de los residuos polimórficos, los cuales están involucrados en el reconocimiento de la molécula de histocompatibilidad por anticuerpos y el receptor de células T (TCR) y también en la interacción con el antígeno foráneo [2]. Los dominios $\alpha 3$ y β_2 microglobulina son estructuras compuestas por dos hojas β antiparalelas, cada una con 4 y 3 cadenas, conectadas por un puente disulfuro. Esta estructura terciaria fue descrita para los dominios de las inmunoglobulinas y era la esperada a partir de la homología de secuencias encontradas con las regiones constantes de las inmunoglobulinas. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ forman, entre los dos, una hoja plegada β antiparalela, con una α hélice en el extremo C-terminal de cada dominio. En el dominio $\alpha 2$, la α hélice se encuentra unida a la hoja plegada β por un puente disulfuro (aa 164-101). Las α hélices de estos dos dominios, conforman las paredes del surco antigénico y las hojas plegada β constituyen el piso del mismo. Este surco de 25 Å de longitud y de 10 Å de ancho, contiene residuos polares y no polares, varios de los cuales son críticos para el reconocimiento del TCR y el anclaje del péptido [3-5].

Existen tres tipos de moléculas de clase I, que se diferencian solamente en la cadena α y están codificadas por genes separados dentro del HLA. Estas tres formas o isotipos, HLA-A, HLA-B y HLA-C, son muy polimórficas, habiéndose secuenciado hasta el momento 98 alelos de HLA-A, 212 de HLA-B y 51 de HLA-C [6]. Como ya se mencionó, la expresión de estas moléculas es codominante, así una célula expresa seis moléculas

distintas de clase I en su superficie. En general, el alto polimorfismo que existe en poblaciones provoca que un individuo sea heterocigota para todos estos loci.

Las primeras variantes HLA se detectaron con aloantisueros provenientes de placentas de madres múltiparas o de individuos politransfundidos. Con varios aloantisueros, que reconocen diferentes antígenos HLA, se podían tipificar las diferentes variantes o especificidades de un individuo. Dada la homología estructural y de secuencia de los diferentes loci de clase I existen epitopes comunes a los tres tipos de moléculas. Estos epitopes dificultaron la diferenciación de las variantes codificadas por un sólo locus de las codificadas por los otros loci. De esta manera se podían llegar a distinguir aproximadamente 20 especificidades del locus HLA-A, 42 del locus HLA-B y 8 del locus HLA-C. En trabajos colaborativos realizados a partir de 1964, varios laboratorios intercambian antisueros y células de diferentes grupos étnicos y estudian los antígenos HLA con diferentes técnicas, como clones T citotóxicos, patrones de restricción en el ADN y secuenciación nucleotídica de sus genes. En estos talleres se reconocieron diferentes formas alélicas de cada una de las especificidades serológicas, lo que significaba que la complejidad era aún mucho mayor. Analizando la secuencia nucleotídica de los alelos de los diferentes loci se observó una gran homología, existiendo un 58-85% de similitud entre HLA-A, B y C [7]. Por otra parte, las diferencias aminoacídicas no se distribuyen al azar sino en determinadas posiciones, que como mostró la estructura tridimensional de la molécula, están en íntimo contacto con los péptidos que presentan. Estas posiciones polimórficas determinan el tipo de péptido que se une, de esta manera, cada alelo podrá unir un determinado grupo de péptidos. Otras regiones polimórficas interaccionan con el TCR el que reconoce tanto el péptido antigénico como el alelo HLA.

Estudios de separación de péptidos de las moléculas de clase I y la cristalografía de rayos X mostraron que estos eran en general nonapéptidos. Los mismos se ubican en el surco de la molécula HLA y se encuentran anclados por ciertas cadenas laterales de sus aminoácidos que se sitúan en huecos de la molécula denominados bolsillos (“pockets”).

Las moléculas de clase I poseen seis bolsillos, A, B, C, D, E y F. Los A y F conforman los extremos del surco y poseen residuos bastante conservados en todas las moléculas de clase I, determinando que la orientación y el tamaño del péptido sea siempre la misma [8]. En otros estudios, se han encontrado péptidos de 10 a 12 aminoácidos, los que también se anclan por los extremos a los bolsillos A y F pero el centro del péptido sobresale hacia fuera [9].

Moléculas de Clase II

Las moléculas de clase II, que presentan péptidos a linfocitos T CD4, también son heterodímeros formados por una cadena alfa y otra beta unidas de forma no covalente y codificadas por genes A y B respectivamente. Las dos cadenas se encuentran codificadas en el sistema HLA y presentan un alto polimorfismo. La cadena α tiene 229 aminoácidos (32-34 Kd) y la β 237 aminoácidos (28-29Kd) [10], cada una posee dos dominios externos globulares, estabilizados por un puente disulfuro entre cisteínas separadas entre sí por unos 65 residuos (la cadena α sólo posee este puente en el dominio más cercano a la membrana) [11]. En la cadena β , el dominio β 1, el más alejado de la membrana, tiene 94 residuos y se conecta con el dominio β 2, contiguo a la membrana, de 84 residuos. Le siguen 10 residuos hidrofílicos que unen el β 2 con el dominio transmembránico de 21 residuos hidrofóbicos, finalizando con una cola intracitoplasmática de 8-18 aminoácidos (según el locus) del extremo C terminal. La cadena α presenta una estructura muy similar a la β con cuatro dominios, dos externos, α 1 y α 2, uno transmembránico y una cola citoplasmática. Las dos cadenas se encuentran glicosiladas, la cadena α en los residuos 78 y 118 y las β en el residuo 19.

La similitud existente entre las moléculas de clase I y las de clase II, en la organización génica y de dominios proteicos hizo suponer que la estructura tridimensional era muy semejante [12]. Asimismo, encontramos una cierta homología de secuencias, y la existencia de receptores T que pueden reconocer ambos tipos de moléculas [13]. Los

dominios externos $\alpha 1$ y $\beta 1$ de las moléculas de clase II conforman el surco antigénico y son equivalentes a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de clase I. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ tienen una gran homología con dominios de inmunoglobulinas como ocurre con $\alpha 3$ y $\beta 2m$ en las moléculas de clase I. La cristalografía de la molécula HLA-DR1 [11] mostró una gran semejanza estructural con las de clase I. Las α hélices del surco antigénico se encuentran más abiertas en los extremos, lo que permite que haya interacción con péptidos más largos (15-24 aa). Las tirosinas 7, 59 y 171 que unen el péptido en su N terminal y los residuos Y84, K146 y T143 que fijan el extremo C-terminal del péptido en clase I no se encuentran en clase II. Tampoco existe un puente salino entre E55 y R170, W167 que cierra el extremo izquierdo del surco en las moléculas de clase I. Los péptidos que pueden acomodar las moléculas de clase II, sobresalen por los extremos de la molécula. El péptido se ancla por algunas cadenas laterales que se ubican en bolsillos del surco antigénico al igual que sucede en las moléculas de clase I. En un estudio cristalográfico donde la molécula HLA-DR1 presenta un péptido del virus de Influenza se determinó que este se ancla a cinco bolsillos del surco (figura 1). Muchos de los residuos que forman el bolsillo son polimórficos y serían responsables de las diferentes variantes de péptidos que pueden pegar las distintas moléculas HLA. Algunos de los bolsillos muestran una gran restricción en las cadenas que pueden acomodar. Como ejemplo podemos tomar el bolsillo 1 de la molécula HLA-DR1 en el que se ubica la cadena lateral de la Y308 del péptido de influenza (HA306-318)[14]. En este bolsillo existe una fuerte preferencia por residuos hidrofóbicos y este parece ser el determinante principal del pegado del péptido. Algunos aminoácidos de este bolsillo están conservados en varias moléculas DR (cadena α y residuos F $\beta 89$ y T $\beta 90$), pero la entrada de un residuo puede estar modulada por el polimorfismo V-G encontrado en el aminoácido 86 de la cadena β (figura 2). El cambio de G por V coloca la cadena lateral de la valina en donde se ubica el grupo hidroxílico Y308 de HA y restringe así el tamaño del aminoácido que puede acomodar en esta posición. Esto nos da un ejemplo de la restricción que puede tener cada bolsillo dirigida por los diferentes polimorfismos de la molécula.

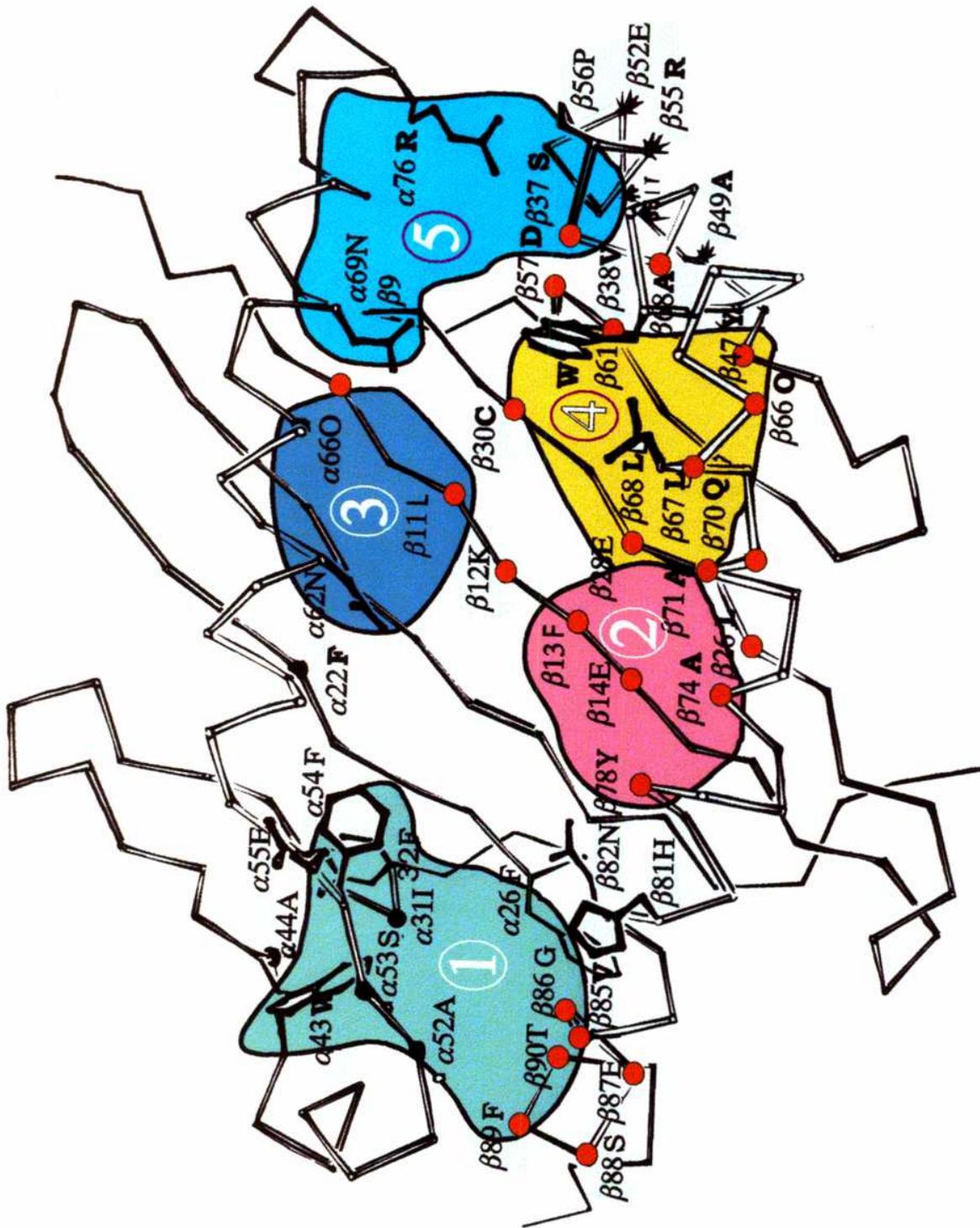


Fig.1
Estructura tridimensional de la molécula HLA-DR1
 Estructura en la que se muestran los cinco bolsillos de anclaje del péptido antigénico y los aminoácidos involucrados en cada uno de ellos. De izquierda a derecha los bolsillos 1, 2, 3, 4 y 5.

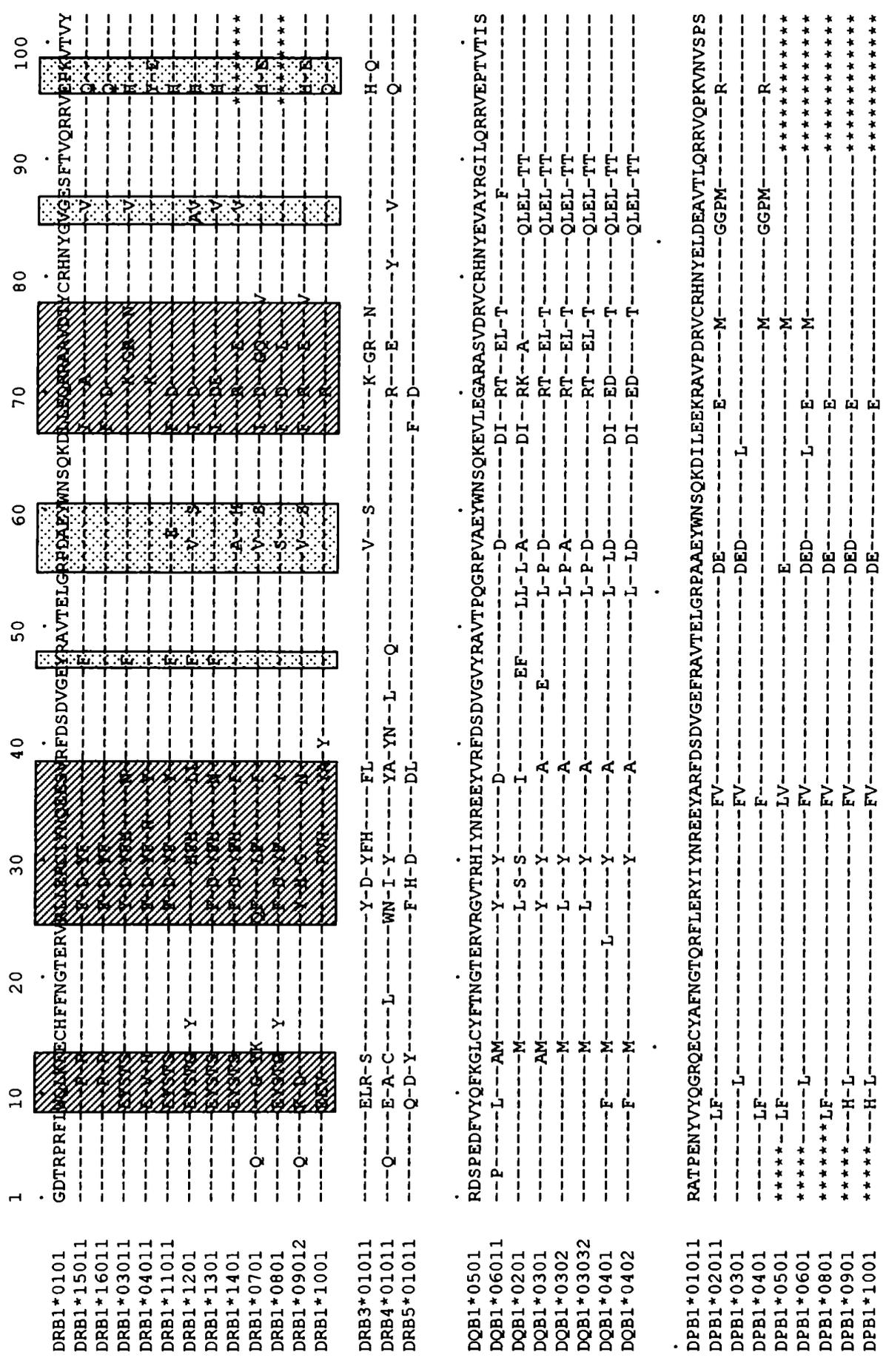


Figura 2
Secuencias aminocídicas del Exón 2 de alelos de los loci DRB1, DQB1 y DPB1. Se recuadran las regiones hipervariables (azul) y otras regiones polimórficas (rojo).

De esta manera, cada alelo podrá presentar un grupo de péptidos caracterizados por poseer determinados aminoácidos en ciertas posiciones. A este patrón de residuos, intrínseco de cada alelo y que determinan el grupo de péptidos que podrán interactuar con él, se lo llama “motivo peptídico del alelo”.

Otra de las características de las moléculas de clase II que se observó por primera vez en la cristalografía de la molécula DR1, es que los heterodímeros cristalizan formando dímeros. Este tetrámero $(\alpha\beta)_2$, hallado en varios trabajos, indicaba que probablemente se encuentre en esta forma en la superficie celular. En la última cristalografía de una molécula DR, el tipo DR4 unido a un péptido del colágeno II, no se encontró dimerizada [15]. El modelo de tetrámero nos daría una nueva visión de la selección en timo y de la presentación antigénica a células T, pero el estudio con el DR4 no apoya esta teoría. Por otro lado, se ha propuesto que el receptor T también podría formar tetrámeros $(\alpha\beta)_2$ que interaccionarían con la molécula de clase II de una manera divalente [16].

Interacción del TCR con el complejo MHC-péptido

El receptor de los linfocitos T es un heterodímero formado por dos cadenas, α y β , que se encuentra unido a otras moléculas de membrana (complejo CD3). El TCR presenta gran homología, a nivel de secuencia aminoacídica y de estructura, a la región Fab de los anticuerpos. Cada cadena posee tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), que son las que reconocen el ligando. Este ligando está constituido por el péptido antigénico unido a la molécula de histocompatibilidad. De las tres CDRs, CDR1 y CDR2 son las regiones que presentan menor diversidad y las que reconocen la molécula de histocompatibilidad, mientras que la CDR3, que presenta mayor variación, reconoce el péptido antigénico [17]. El TCR se ubica en diagonal sobre la molécula de histocompatibilidad unida a su péptido y con las CDR1 y CDR3 de las cadenas α y β contactando el péptido. Esta posición del TCR sobre la molécula de histocompatibilidad

se observó tanto en las cristalografías de TCR humano como de ratón, aparentemente como resultado de propiedades compartidas entre las moléculas de histocompatibilidad de clase I y de clase II, así como también, de todos los TCR $\alpha\beta$ [4, 18]. De esta manera la posición del TCR seguiría un modelo general, tanto para clase I como para clase II. Estudios cristalográficos y de mutagénesis reconocieron los sitios de interacción entre el TCR y la molécula de histocompatibilidad [4]. De esta forma, se reveló que las substituciones de los aminoácidos Leu 67, Gln 70 y Arg 71 de la cadena β del HLA-DR1, alteraban el reconocimiento de varios clones de LT [19]. Existen también residuos que están escondidos dentro de la molécula de HLA que pueden modificar el reconocimiento de una forma indirecta. Los residuos β 30 y β 86 del HLA-DR1, a pesar de encontrarse en regiones que no contactan al TCR ni modifican la unión del péptido, si se los cambia, alteran el reconocimiento del LT [19, 20]. Tenemos, de esta forma, los principales residuos de las moléculas de histocompatibilidad que pueden alterar de alguna manera el reconocimiento antigénico, ya sea para eliminar o aumentar la respuesta del LT.

Como ya se mencionó, el polimorfismo actúa también a nivel de la unión del péptido antigénico, de esta manera, cada alelo podrá presentar diferentes tipos de péptidos y generar distinta intensidad de respuesta, otorgando una ventaja o desventaja adaptativa al portador.

Función de las moléculas MHC

Las moléculas MHC son las encargadas de presentar péptidos antigénicos a los LT [1]. Si el péptido presentado es antigénico entonces se desencadenará una respuesta inmune contra dicho agente.

Los TCRs de los LT reconocen el antígeno en el contexto de la molécula MHC. Estos LT son seleccionados para que puedan cumplir su función en un proceso que se denomina selección tímica, que tiene como objetivo eliminar clones de LT con receptores que no reconocen ningún tipo de MHC del individuo y de clones LT que son potencialmente autorreactivos. Esta selección comprende dos pasos: la selección positiva y la negativa. La

primera es el proceso por el cual los LT que no reconocen ninguna MHC propia, son eliminados y los LT que reconocen alguna de las MHC propias continúan con la maduración. En la selección negativa, los LT que interaccionan con MHC-péptidos propios con alta afinidad, son eliminados, lo que evita que estos LT autorreactivos salgan a circulación. De esta manera se genera LT que pueden reconocer péptidos antigénicos unidos a MHC propias y que son autotolerantes.

La presentación de antígenos por distintos tipos de MHC produce respuestas diferentes. Las MHC de clase I interaccionan con LT CD8 citotóxicos. Estas moléculas presentan péptidos derivados de proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático de la célula. Una célula infectada por un virus presenta péptidos de éste, los que son reconocidos por algún LT CD8, que destruye la célula infectada. Las MHC de clase II presentan péptidos de bacterias, toxinas extracelulares o de patógenos que infectan vesículas intracelulares a LT CD4. Estos LT se pueden diferenciar en dos tipos de células efectoras, las T_H1 y T_H2 [21]. Los LT CD4 T_H1 activan las propiedades microbicidas de los macrófagos e inducen la producción de inmunoglobulinas IgG. Los LT CD4 T_H2 activan la producción de IgM por linfocitos B antígeno específicos y también de diferentes isotipos como IgA e IgE.

Organización genética del sistema HLA

El sistema HLA se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 entre las regiones 6p21.31 a 6p21.33. Dicho complejo abarca más de cien genes y ocupa aproximadamente 4000 kilobases (2-3 centimorgans). Según la función de los primeros genes descubiertos, se lo dividió en tres regiones: la región de clase I, la de clase II y la de clase III. La de clase I es la cercana al telómero y abarca unas 2000 kb. La región de clase II es la centromérica y la de clase III se encuentra entre la de clase I y la de clase II (figura 3).

La distancia que separa a estos genes, da una idea del ligamiento que existe entre ellos. Muchos alelos de genes diferentes se encuentran combinados en un mismo cromosoma con una frecuencia mayor a la que se observaría por recombinación al azar, por lo tanto, se dice que estos alelos están en desequilibrio de ligamiento. Este grupo de alelos combinados en un mismo cromosoma, que se hereda en bloque, se lo denomina haplotipo. Por otro lado existen genes que no se encuentran en todos los individuos y se los encuentra asociados a ciertos alelos de un locus cercano, esto sucede entre los loci DRB, como describiremos más adelante. A este grupo de genes que se hereda en bloque, también se lo denomina haplotipo.

Región de clase I

Los genes que codifican para la cadena α de las moléculas de clase I son los HLA-A, HLA-B y HLA-C que codifican la cadena α de las moléculas clásicas de clase I. Los genes HLA-B y HLA-C se ubican cercanos a la región de clase III, separados entre sí por 80 kb, la que provoca que la frecuencia de recombinación de estos genes sea muy baja. Por esta razón, los alelos de estos dos genes se encuentran muy ligados. El gen HLA-A se encuentra a más de 1000 kb de los HLA-B y HLA-C hacia el telómero y por lo tanto el ligamiento es bajo.

Además de los genes clásicos encontramos genes que codifican para moléculas no clásicas como HLA-E, HLA-F, HLA-G y los genes MIC. De la región centromérica a la telomérica, primero se encuentra el HLA-E, a 900 kb de HLA-C y se expresa en altos niveles en LT en reposo, eosinófilos, linfocitos B, piel y con baja densidad en hígado y placenta. El HLA-H, un pseudogen, se ubica a 100 kb de HLA-A hacia el telómero. Contiguos al HLA-H se encuentra los genes HLA-G y HLA-F a 80 kb y 180 kb respecto del primero. El HLA-G tiene la expresión restringida a la placenta con una probable función inmunológica en la gestación. Los genes MIC (cinco hasta el momento) tienen

una cierta homología a los genes de clase I y se especula que pueden llegar a unir péptidos.

Región de clase II

Los loci de clase II, llamados también HLA-D, se hallan dispersos en la región más centromérica del sistema, abarcando aproximadamente 1000 kb. Esta región codifica para las moléculas clásicas de presentación, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP (DR, DQ y DP). Además, en la región de clase II se encuentran genes que expresan proteínas asociadas al procesamiento citoplasmático de proteínas antigénicas, otros involucrados en el transporte peptídico al retículo endoplasmático y otros cuyo producto se desconoce su función (figura 3).

Próximo a la región de clase III se encuentra la subregión DR, el gen DRA se ubica en la zona telomérica y codifica para la cadena α de las moléculas DR. Siguiendo en dirección al centrómero unas 150 kb se hallan nueve genes DRB, algunos de los cuales codifican para la cadena β y otros son pseudogenes. Estas diferentes cadenas β se unen con la única cadena α formando así distintos heterodímeros. El principal de estos genes es el DRB1, cuyo producto junto con la cadena DR α forman los antígenos DR. Los productos de los genes DRB3, DRB4 y DRB5 con la cadena DR α forman los antígenos DRw52, DRw53 y DRw51 respectivamente. Estos genes, que no están presentes en todos los individuos, tienen un altísimo desequilibrio de ligamiento con ciertos alelos del locus DRB1 (figura 4). Existen también, en esta región, pseudogenes como los DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 y DRB9, los cuales pueden encontrarse en determinados haplotipos.

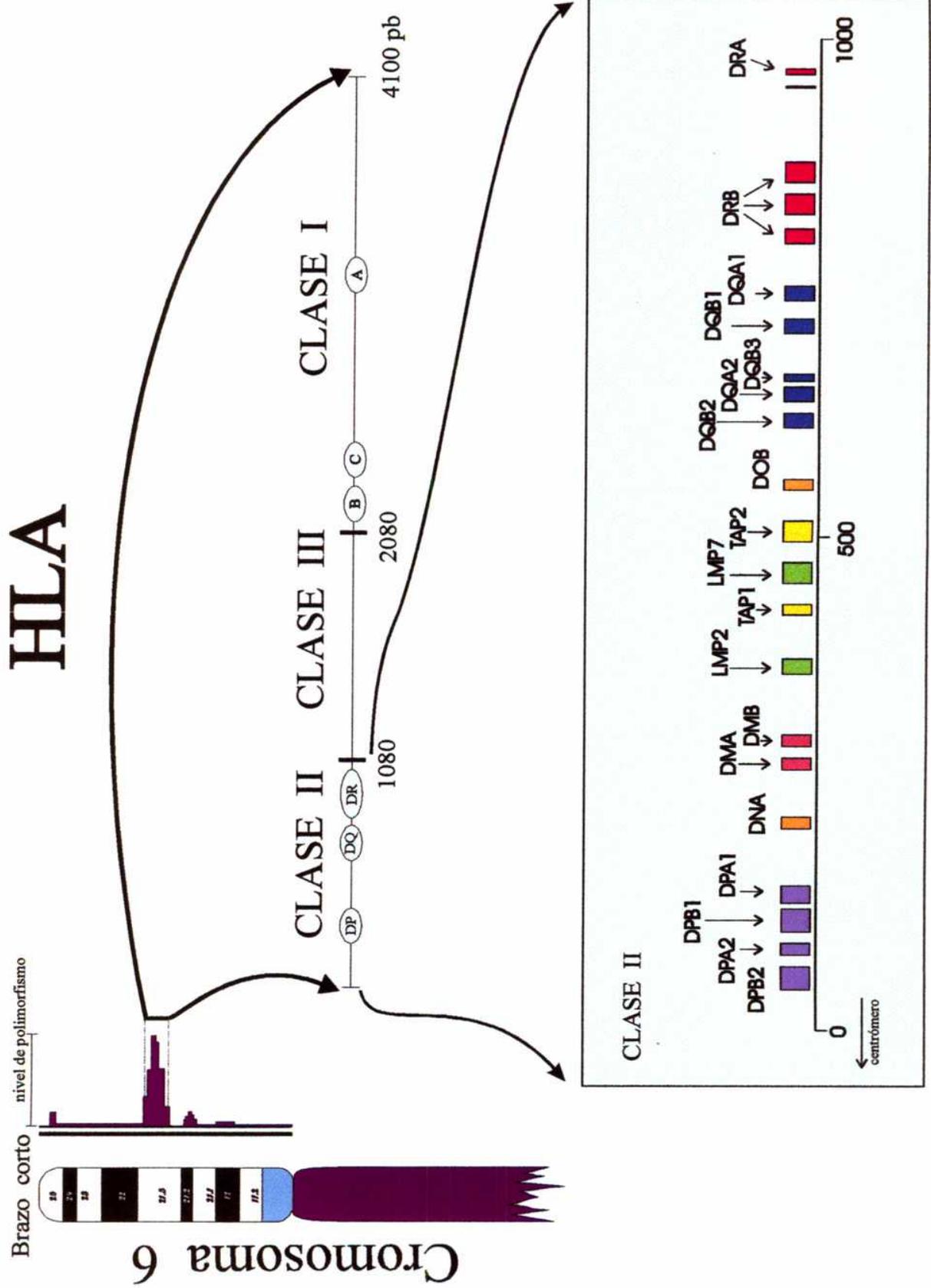


Figura 3
Mapa del sistema HLA

HAPLOTIPOS

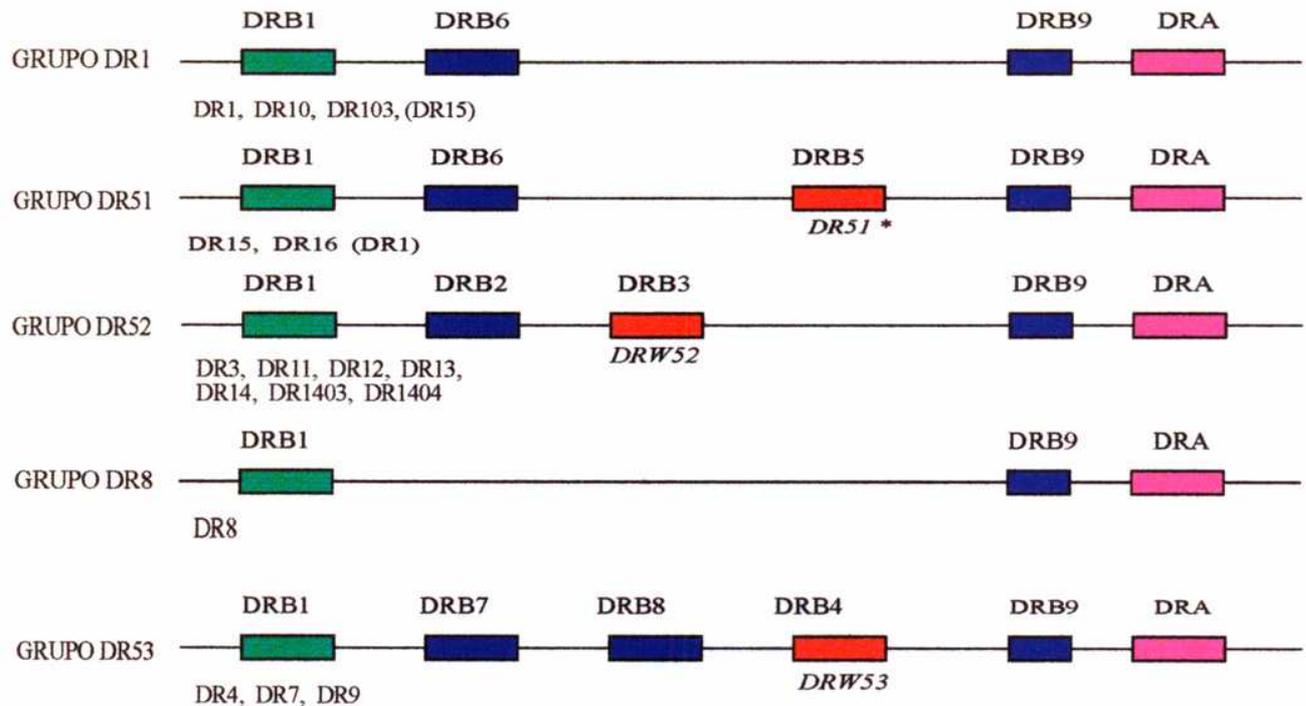


Figura 4

Se muestra los diferentes haplotipos encontrados en la región DR. Los alelos del locus DRB1 asociados al haplotipo se enumeran abajo del recuadro del locus DRB1. A la derecha de este se encuentran los genes (rojos) y seudogenes (azules) del grupo.

Hacia el centrómero, de la subregión DR le sigue la subregión DQ. Los genes DQA1 y DQB1 codifican las cadenas α y β de la molécula DQ y se encuentran entre 80 y 240 kb de DR, según el haplotipo. A estos genes los siguen el DQA2 y el DQB2 que si bien no parecen tener defectos estructurales, no se han encontrado sus productos. Entre DQB1 y DQA2 existe un pseudogen, el DQB3, que carece del exón 2. A la subregión DQ le siguen los genes DOB, LMP2 y LMP7, y los TAP1 y TAP2. El primero de estos se expresa en timo y linfocitos B asociado a una cadena α codificada por el gen DNA, aunque se desconoce el papel de esta molécula. Los genes LMP codifican para proteínas del proteasoma, un complejo multicatalítico citosólico que produce péptidos, los que son

presentados por moléculas de clase I. Los genes TAP expresan un heterodímero que se ubica en la membrana del retículo endoplasmático y transporta péptidos procesados hacia el lumen. A 60 kb del gen LMP2 se hallan los genes DMB y DMA que codifican para la molécula DM. Estos genes tienen cierta homología con otros genes de clase II. Se expresan en todas las células presentadoras y actúan en la vía exógena de presentación antigénica. A estos genes le siguen el gen DNA ya nombrado y los genes DP, DPA1 y DPB1, que codifican para la molécula DP. Por último encontramos dos pseudogenes con homología a los DP, DPB2 y DPA2.

Región de clase III

Entre las regiones de clase I y de clase II se encuentra la de clase III. Esta región codifica proteínas que no tienen una función en la presentación antigénica, pero algunas cumplen funciones inmunológicas. A 300 kb de HLA-B se ubican los genes que codifican para dos citoquinas, TNF β y TNF α . Estas citoquinas son secretadas por linfocitos T y macrófagos en respuestas inflamatorias. Estos genes tienen aproximadamente un 35% de homología lo que hace suponer que se generaron de un ancestro común. Hacia el centrómero encontramos el gen G7a que codifica para la valil tRNA sintetasa, que no actúa en la respuesta inmune. Luego se encuentran genes que codifican para proteínas de estrés térmico de la familia de las HSP-70, que parecen jugar un papel muy importante en mecanismos primitivos de defensa. A 350 kb del gen TNF α se ubican dos genes del sistema complemento, el C2 y el factor B. El primero de la vía clásica y el segundo de la vía alternativa del complemento. Estos genes poseen escaso polimorfismo y una homología del 67% entre sí. A 30 kb del factor B se hallan los genes que codifican para el cuarto componente del complemento (C4). Existen dos genes que expresan dos variantes isotópicas del C4; C4A y C4B, con siete alelos para cada uno de ellos, aunque algunos de estos son nulos. Entre estos genes se ubica el gen de la 21 hidroxilasa (21OH), una enzima mono oxigenasa, con un grupo hemo con actividad de p450 que participa en la biosíntesis

de esteroides de la corteza adrenal. Existen dos genes homólogos: 21OHA y el 21OHB; siendo el 21OHA un pseudogen.

Estructura de los genes HLA

Los genes de clase I están constituidos por ocho exones. El exón 1 codifica para el péptido señal, los exones 2, 3 y 4 codifican para los dominios extracitoplasmáticos de la cadena pesada α , los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ respectivamente. El exón 5 codifica para la región transmembránica y los 6 y 7 para la cola intracitoplásmica. El último exón posee la región 3' no traducida. Estos genes tienen una longitud de aproximadamente 4 kb [22-24].

Los genes de clase II que codifican para las cadenas β contienen seis exones. El primero codifica para el péptido señal y los primeros cuatro aminoácidos del dominio $\beta 1$. Los exones dos y tres codifican para el resto del dominio $\beta 1$ (aminoácidos 5-95) y el $\beta 2$ (aminoácidos 96-189) respectivamente. El exón cuatro codifica el péptido de unión, la región transmembrana y los primeros cuatro aminoácidos de la cola citoplasmática. El exón cinco, codifica ocho residuos de la cola y el exón seis, los últimos tres aminoácidos de la cola y la región 3' no traducida [25, 26] (figura 5).

Los genes que codifican las cadenas α de clase II incluyen cinco exones. El primer exón abarca la región 5' no traducida, el péptido señal y los dos primeros aminoácidos de la región amino terminal. Los exones 2 y 3 codifican los aminoácidos 3-84 y 85-178 de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ respectivamente. El dominio transmembránico, la cola citoplasmática y parte de la región 3' no traducida se encuentran en el exón cuatro, la otra parte de esta última región forma el exón cinco [27]. La longitud del gen es de aproximadamente 8 Kb (figura 5).

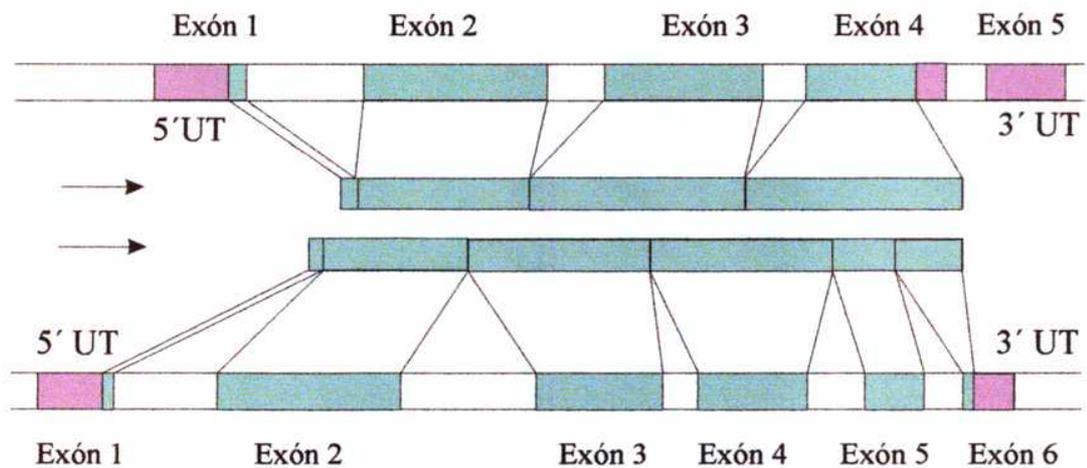


Figura 5
Esquema de los genes A y B de clase II.

Regulación y expresión de las moléculas HLA de clase II

La regulación precisa de la expresión de los genes HLA cumple un papel muy importante en el control de la respuesta inmune.

Estos genes se expresan específicamente en células presentadoras profesionales como son los linfocitos B, células dendríticas, en linfocitos T activados y en varios tipos celulares del linaje macrófago-monocítico. En condiciones normales, se ha observado la expresión de estas moléculas en otros tejidos como intestino, sistema respiratorio, tejido sinovial, placenta, riñón, glándulas mamarias y tracto urinario bajo [28-31].

El nivel de expresión es variable, siendo alto en células linfoides, moderados en la mayoría de las células y bajo en otros tejidos como en hepatocitos. Este nivel puede ser modulado por interferón α , β o γ , que aumentan el nivel de expresión. Las regiones promotoras se encuentran en dos regiones limitadas por los nucleótidos -160 a -190 y en la región -139 a -167. En la primer región se ubican los promotores κB_1 y κ_2 , y en la

segunda el elemento que responde a interferón (IRE). También se encuentra alrededor de -90 un *enhancer* denominado B y un elemento que responde a AMPc (CRE).

La expresión de los genes de clase II está estrictamente regulada. Los genes A y B, bajo condiciones normales, se regulan de forma coordinada. La modulación puede estar mediada por diferentes moléculas como citoquinas, glucocorticoides y prostaglandinas. Las interleuquinas IL-4, IL-10, IL-13[32-34], GM-CSF[35], IFN γ y TNF- α [35], aumentan su expresión en varios tipos celulares. A su vez otras citoquinas como TGF- β , CSF-1, IFN α y β , disminuyen la expresión de los genes de clase II [36].

La expresión es regulada principalmente al nivel de la transcripción. El primer sitio de regulación se encuentra 150 bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Este sitio posee cuatro secuencias conservadas activadoras en cis. Estas secuencias denominadas cajas S, X₁, X₂ e Y se encuentran en todos los genes de clase II A y B. Estos cuatro elementos actúan de forma conjunta contribuyendo al funcionamiento óptimo del promotor.

Tres de los complejos que se unen a este promotor son los más relevantes en la regulación: RFX, NF-Y y X2BP. Los mismos se expresan en casi todos los tipos celulares independientemente de la expresión de MHC de clase II. Mediante ensayos de complementación se descubrieron dos factores específicos para la expresión de clase II, el CIITA (transactivador de clase II), localizado en el cromosoma 16 humano [37] y el RFX5 (una subunidad del complejo RFX) [38].

La transfección del cDNA de CIITA, en células con deficiencia en la expresión de MHC de clase II, restablece la expresión de las moléculas DR, DQ, DP y DM. El modo de acción del CIITA no se lo conoce pero se especula que funciona como un coactivador que no se une al ADN. Puede ser inducido por IFN γ , aumentando su expresión varias horas antes del incremento de MHC de clase II [39]. El RFX5 posee un dominio de unión al DNA (DBD), característico de la familia de proteínas que se unen a la caja X. La

transfección de su cDNA también restaura la expresión de las MHC de clase II y de DM. El gen que codifica para el factor RFX5 se localiza en el cromosoma 1[39].

Presentación antigénica

Las moléculas HLA de clase I y de clase II unen péptidos durante la maduración biosintética y realizan un continuo recambio de antígenos intracelulares y del medio para su control. Existen tres pasos en el cargado de péptidos en las moléculas de HLA: la captación, el procesamiento y la presentación antigénica.

La respuesta inmune en general actúa de dos modos diferentes dependiendo del agente que se quiera atacar. Si el agente infecta células la principal respuesta que desencadena será de citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8. En cambio si el agente es extracelular, la principal respuesta está dada por linfocitos T CD4 que desarrollan una respuesta inflamatoria y de producción de anticuerpos. Para cada uno de estos modos existe una vía de presentación diferente. La vía exógena o endocítica que capta y presenta péptidos de antígenos exógenos y la vía endógena o biosintética que presenta péptidos endógenos.

Las células presentadoras de antígenos (CPA) captan moléculas extracelulares y las presentan en MHC de clase II. La captación esta mediada por receptores de membrana de la CPA, que pueden ser inmunoglobulinas de membranas o receptores Fc de Igs[40, 41]. Estas moléculas son endocitadas en vesículas endocíticas las que se unen con otras y van formando una vesícula más grande que acidifica el medio interno. Estas vesículas poseen enzimas que reducen enlaces disulfuro y numerosas proteasas como las catepsinas B, D y E. A esta vesícula se le une otra que proviene del Golgi que transporta las MHC de clase II. Durante la biosíntesis de estas moléculas en el retículo endoplasmático rugoso el heterodímero $\alpha\beta$ se asocia a la cadena invariante Ii. Esta cadena tiene dos funciones: a) proteger a la molécula MHC de la unión a péptidos endógenos y b) el transporte selectivo

de las mismas a las vesículas endosomales[42]. Cuando se unen estas vesículas con las que transportan los péptidos antigénicos, las proteasas cortan la cadena Ii y dejan a las moléculas MHC unidas a un péptido de 25 aminoácidos llamado CLIP (residuos 83 a 108 de la cadena Ii). Para que la molécula MHC pueda unirse a los péptidos del endosoma tiene que liberarse del péptido CLIP, asistido por la molécula HLA-DM[43, 44]. Una vez liberado el CLIP, puede cargar péptidos y ser transportada a la superficie celular. En linfocitos B se demostró que el reciclaje de estas moléculas es muy rápido, a razón de 3000 moléculas por minuto. La vida media de estas moléculas en la superficie celular depende de la naturaleza del péptido, que afecta la estabilidad y permanencia en superficie.

La presentación de péptidos endógenos por moléculas de clase I es realizada por una vía diferente a la de clase II, la vía biosintética o endógena. Esta vía, a diferencia de la de clase II, se captan péptidos provenientes de proteínas endógenas que se encuentran en el citoplasma. Las proteínas citoplasmáticas son modificadas mediante el agregado del péptido ubiquitina, que facilita el reconocimiento para su degradación. El complejo multicatalítico denominado “proteasoma” es el encargado de la degradación de esta proteína-ubiquitina. Dos de las subunidades del proteasoma se encuentran codificadas dentro del sistema HLA por los genes Lmp-2 y Lmp-7. Una vez degradada la proteína, los péptidos son transportados al lumen del retículo endoplasmático rugoso por un transportador de membrana denominado TAP, que al igual que los en genes Lmp, sus dos cadenas se encuentran codificadas en el sistema HLA por los genes TAP1 y TAP2. Este transportador pertenece a una superfamilia llamada transportadores ABC que son encargados de transportar iones, aminoácidos, azúcares y péptidos, en procariotes y eucariotes. El TAP restringe el transporte a péptidos de 6-15 aminoácidos. Luego de la biosíntesis de las cadenas de HLA de clase I, la cadena pesada α se une transitoriamente a una molécula P88 o calnexina y este dímero se asocia a la β_2 microglobulina. El dímero $\alpha\beta$ formado, se une al transportador TAP a la espera de su péptido. Cuando TAP transporta el péptido desde el citoplasma lo recibe la molécula HLA y esta unión otorga gran estabilidad a la molécula. Una molécula de clase I sin péptido es llevada al Golgi

donde será degradada. El heterotrímero α/β_2m /péptido migra a través del Golgi a la superficie celular.

Polimorfismo del sistema HLA

Una de las características más sobresalientes de este sistema es su altísimo polimorfismo molecular. La gran variabilidad de estos genes determina en un individuo el repertorio de linfocitos T, la respuesta de células “natural killer”(NK) y modula la respuesta inmune contra antígenos específicos. La diversidad en el sistema HLA es tan grande que es poco probable encontrar dos individuos no relacionados con el mismo genotipo HLA. Como consecuencia de esto, la respuesta contra agentes infecciosos, células transformadas, tejidos transplantados y autoantígenos varía de persona a persona. No existe un tipo silvestre que se pueda estudiar como modelo general. Por lo tanto, para el mejor entendimiento de la respuesta inmune es necesario el estudio de todos los tipos HLA. Por otro lado, la gran diversidad hallada en estos loci hace de ellos una maravillosa herramienta para estudios evolutivos de poblaciones humanas y sus relaciones con diversos patógenos.

La mayoría de los loci que actúan en la presentación de péptidos antigénicos tienen al menos cierto grado de polimorfismo. Los genes que codifican para las moléculas clásicas de presentación son los que muestran una mayor diversidad. A partir del descubrimiento de los antígenos HLA de clase I, éstos comenzaron a estudiarse usando técnicas serológicas. En los últimos 15 años la aplicación de ensayos de reconocimiento por células T, análisis con enzimas de restricción y secuencia nucleotídica demostraron que cada antígeno serológico abarca un grupo de alelos cercanos.

El estudio del polimorfismo de estos loci, en poblaciones humanas, muestra ciertos rasgos que pueden caracterizar a cada una de estas poblaciones. Las frecuencias alélicas de estos genes varían en diferentes poblaciones. Además, se encontró que grupos muy

diferentes pueden tener alelos distintivos. Un ejemplo de esto se observa en tribus de amerindios, donde los alelos DRB1*0411 y el DRB1*1402 son los más frecuentes, mientras que éstos no se hallan en poblaciones negras sudafricanas.

Evolución de los genes HLA de Clase II

Las secuencias de ADN que poseen una gran homología pueden estar relacionadas por derivar de un ancestro común. Es decir, existió una secuencia ancestral que se duplicó y generó dos secuencias iguales en el mismo genoma. Estas secuencias parálogas fueron acumulando mutaciones al azar, que tal vez, por efecto de la selección natural, fueron mantenidas en la población. De esta manera, a lo largo del tiempo, estas secuencias parálogas difieren cada vez más unas de otras. Analizando las diferencias nucleotídicas de las mismas, se puede especular sobre la historia evolutiva y el momento de la duplicación. Dos secuencias pueden también divergir luego de un proceso de especiación. El análisis de estas secuencias ortólogas, originadas a partir de un ancestro del que se separaron dos especies, nos permite teorizar sobre la historia evolutiva de estas dos especies y del tiempo en que se separaron. El estudio de secuencias ortólogas y parálogas en diferentes especies nos muestra las relaciones existentes entre dichas secuencias y especies, pudiéndose mostrar estas relaciones en árboles filogenéticos. Un tipo de estudio complementario, es el análisis de eventos especiales, como pueden ser las inserciones y las deleciones.

Origen de los loci HLA de Clase II

Cuando se comparan los diferentes genes de clase II, se diferencian dos grupos principales: los genes A y los B. Se estima que estos dos genes se originaron por un evento de duplicación de un gen ancestral, hace unos 370 millones de años (ma.), 130 ma. después del origen de los vertebrados [45]. Este suceso se anticipa a la divergencia de

aves y mamíferos. El hecho de que el gen estudiado en aves es muy similar a un gen B y no a uno intermedio entre los genes A y B apoya esta teoría. Dentro de los mamíferos que han sido estudiados, los roedores son los que más divergieron. El sistema H-2 (MHC de ratón) difiere más que otros, como lagomorfos, artiodáctilos y primates, los que se separan de los roedores como un grupo.

Los genes A se dividen en dos ramas, una con los genes DPA y DRA y la otra con los DQA y el DNA, este último parecería ser el más antiguo de todos estos genes. Este patrón indica que probablemente hubo dos eventos de duplicación, el primero originó los ancestros de cada rama y el segundo los cuatro genes A. Los pseudogenes DPA en humanos y felinos tiene en común dos deleciones, el codón 216 y el nucleótido 225, lo que muestra que la falta de función precede a la divergencia de estos grupos, estimándose la separación en unos 65 ma. [45]. A diferencia de lo que ocurre con el DPA, el DQA2 sólo se encuentra en hominoideos el que debe haberse duplicado después de la separación de este linaje del de los cercopitecoideos (rhesus, babuinos) [46].

La homología que existe entre los genes B de varias especies de mamíferos es mucho mayor que la de los mismos con los genes A. Las cuatro regiones DO, DR, DQ y DP presentan una clara relación entre ellas y con otros genes ortólogos de otras especies de mamíferos. El análisis de sustituciones nucleotídicas en los exones 2 y 3 infiere la aparición de estos genes en el siguiente orden: DO, DR, DQ y DP, con sucesos de duplicación de DO->DR, DR->(DQ-DP) y DQ->DP hace aproximadamente 200 ma., 130 ma. y 100 ma. respectivamente [45].

El MHC de ratón es mucho más simple que el de humanos, sin embargo, encontramos genes ortólogos para casi todos los loci. De esta manera, para el DRB1 humano esta el gen E β de ratón, para el DPB1 tenemos el A β 3, para el DOB el A β 2 y para el DQB1 el A β . Estos genes se parecen tanto en secuencia como en número y disposición de exones e intrones. Cuando se realiza un árbol filogenético, los genes ortólogos de estas especies se

agrupan juntos. De estos estudios se deduce que los genes DOB/A β 2 fueron los primeros en divergir antes de la radiación de los mamíferos [47].

En la región DQ, el DQB3 es un pseudogen al que le faltan los exones 1 y 2 y que al igual que el DRB6 es muy divergente de los otros DQB humanos. Por lo tanto, el DQB3 y el DRB6 probablemente hayan surgido de un evento de duplicación antes de la separación de los linajes de los roedores y de los primates. Los pseudogenes DQB2, DQA2 y el DRB2 son mucho más recientes, agrupándose con los DQ y DRB humanos más que con los de ratón.

En general, cada grupo de genes, surgieron por duplicación de otro grupo parálogo. Por ejemplo, los genes DQA2 y DQB2 aparecieron por duplicación de los genes DQA1 y DQB1. Los genes DP tienen un origen inusual, ya se nombró la homología del gen DPA1 con el DRA1. En cambio, el DPB1 se asemeja más al DQB1. Esto sugiere que el origen de estos genes fue por dos eventos de duplicación diferentes, lo que explicaría la orientación cola a cola de los mismos. El pseudogen DPB2 se habría originado por duplicación del DPB1, después de la divergencia de los órdenes de mamíferos, ya que dentro de este grupo, estos genes presentan mayor similitud que con cualquier otro gen de otro grupo. Por otro lado, el gen A β 3 de ratón (homólogo al DPB1) divergió antes de la separación de los genes DPB1/DPB2. Por el contrario, el árbol filogenético de DPA agrupa en una rama al gen DPA1 del humano y del conejo y en otra rama al DPA2 humano con el del gato. Esto sugiere que los DPA y DPB aparecen por eventos de duplicación separados [47, 48].

El origen de los diferentes genes DRB es más discutido. Estos genes aparecen en varios órdenes, no sólo en humanos y ratón sino también en bovinos y conejos. Según Anderson, los genes DRB se duplican antes de la radiación de los mamíferos, pero luego son homogeneizados a lo largo del tiempo por intercambio genético [49]. Esta hipótesis es rechazada por Hughes y Nei, que plantean un origen mucho más reciente de los genes DRB. El argumento es que uno de los genes DRB, el pseudogen DRB6, a pesar de estar

agrupado con los otros DRB, se encuentra bastante alejado, lo que indica que este gen, que es el más antiguo de los DRB, no sufrió ningún proceso de homogeneización [47]. Satta y col. estudiaron el intrón 1 de los alelos del gen DRB1 (*03, *04 y *15), y de los genes DRB2, DRB3, DRB4, DRB5 y DRB7. Estas secuencias junto con las de los intrones 4 y 5 de otro estudio se las analizó filogenéticamente. A partir de las mismas, se pueden obtener dos tipos de información: las sustituciones nucleotídicas y las inserciones, principalmente de elementos Alu. Las sustituciones nucleotídicas permiten estimar los tiempos de divergencia y las inserciones, el orden de separación de los genes duplicados. De esta forma se dedujo que el ancestro era un gen semejante al alelo DRB1*04. Mediante cuatro eventos de duplicación, a partir de este ancestro, se generaron los genes DRB2, DRB7, DRB5 y DRB3 en 58 ma., 56 ma., 53 ma. y 36 ma. respectivamente, formando los haplotipos ya conocidos. El DRB4 debe haberse originado por una delección entre los genes DRB1 y DRB2 hace aproximadamente 46 ma. Además, la homología que existe entre los genes DRB2 y DRB6 al nivel de delecciones (los dos carecen del exón 1 e intrón 1) de una secuencia LTR compartida y de las diferencias de sustituciones nucleotídicas en regiones homólogas, hace pensar que estos genes constituyen alelos de un mismo locus [50, 51].

Origen del polimorfismo de Clase II

El rasgo más característico del MHC es el alto polimorfismo que presenta, no sólo por la cantidad de alelos que existen, sino también por la gran distancia genética que tienen algunos alelos de un mismo locus. La explicación más aceptable fue propuesta por Jan Klein, aclarando este hecho con la teoría de la evolución trans-específica del polimorfismo alélico [52].

Las mutaciones que diferencian a los diferentes alelos de un gen de clase II no se ubican al azar. Existen ciertas regiones, principalmente en el exón 2, donde se encuentra la mayor variación. Estas regiones fueron denominadas “regiones hipervariables”. Varios loci del

MHC, como el DRB1, muestran que las diferencias entre alelos, están formadas por la combinación de varios motivos aminoacídicos, indicando que estos alelos pudieron haberse originado por intercambio de secuencias (conversión génica) [53]. Por otro lado, varias evidencias indican que este polimorfismo se encuentra bajo selección [54, 55]. Se observa, por ejemplo, que los codones asociados a la unión de péptidos antigénicos, a diferencia con otras regiones adyacentes, tienen mayor cantidad de cambios no sinónimos que sinónimos, lo que evidencia que estos cambios se encuentran seleccionados positivamente. Estas diferencias selectivas al nivel de secuencia entre regiones que comprometen o no la unión del péptido, implica que regiones distintas pueden no compartir las mismas tasas evolutivas [56, 57].

El análisis de secuencias nucleotídicas de los alelos del locus DRB1 en diferentes especies muestra una gran homología. Por ejemplo, el HLA-DRB1*0701 del hombre se diferencia del Patr-DRB1*0702 del chimpancé en una sustitución no sinónima y otra sinónima, mientras que con el HLA-DRB1*0101, otro alelo humano, se diferencia en 28 sustituciones [58]. De esta manera, se encuentran grupos de alelos de diferentes especies, con una gran homología entre sí, a los que se denomina “linajes alélicos”. Debido a que el exón 2 se encuentran bajo presión de selección y presenta cierta heterogeneidad en las tasas de evolución, según la secuencia analizada, los intrones serían los más apropiados para el estudio de las relaciones evolutivas de los linajes alélicos. En un estudio reciente, Bergstrom y col. estudiaron las relaciones de los distintos linajes alélicos analizando los intrones 1 y 2 del locus DRB1, en humanos y chimpancés [59]. Los linajes alélicos se corresponden con las especificidades serológicas *01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15 y *16. El promedio de divergencia dentro de cada linaje se estima en 250.000 años, a diferencia de los 7 ma. que se obtiene cuando se estudia del exón 2. El aspecto del árbol filogenético para secuencias intrónicas indica que la mayoría de los alelos dentro de un linaje se originaron luego de la separación de las ramas del Homo y Pan [59].

HLA y enfermedad

A partir de 1960, con los hallazgos de polimorfismos a nivel de isoenzimas, grupos sanguíneos y proteínas séricas, se comenzó a investigar la asociación de estos polimorfismos con enfermedades de etiología desconocida. Svejgaard definía el “riesgo relativo” (RR) como, cuantas veces más frecuentemente ocurre la enfermedad en individuos con el antígeno, respecto a la frecuencia de la enfermedad en individuos sin el antígeno. En un estudio, donde se analizaron 53155 pacientes se encontró que existía un riesgo relativo de padecer cáncer de estómago de 1,22, si se poseía el grupo sanguíneo A[60]. En general, ninguno de los marcadores estudiados en ese entonces, mostró un alto RR.

El descubrimiento de los antígenos de transplantes, que presentaban un gran polimorfismo, llevó al estudio de asociaciones con diferentes patologías. Uno de los primeros estudios resultó en el hallazgo de que genes ligados al sistema H-2 (MHC de ratón) controlaban la resistencia a la leucemiogénesis viral [61]. En el año 1973, se describió la primera asociación con el sistema HLA. La Espondilitis Anquilosante, una enfermedad reumatológica, se encontró asociada al antígeno HLA-B27 con un riesgo relativo de casi 70 [62]. En ese entonces, este altísimo riesgo, ilusionó a los investigadores respecto a encontrar otras patologías asociadas al HLA con riesgos similares o mayores y poder así explicar la etiología de la enfermedad estudiada. Sin embargo, esto no resultó tan sencillo ya que las asociaciones descritas tenían un riesgo relativo menor que 15.

En las últimas dos décadas se estudiaron más de 530 enfermedades con asociaciones al sistema HLA. Muchas veces, esta asociación dependía del grupo étnico estudiado. Es importante destacar, que no se describió hasta el momento una asociación absoluta, lo cual indica que la existencia del marcador HLA no es un requerimiento obligatorio para el desarrollo de una determinada enfermedad. La enfermedad con mayor RR descrita, es la narcolepsia, asociada al DR2 y el DQB1*0602, con un RR de 169 [63].

La asociación de una enfermedad autoinmune con el HLA no es sorprendente, ya que una respuesta autoinmune involucra a linfocitos T y la habilidad de éstos para responder a un antígeno depende de la presentación por moléculas HLA. A pesar de esto, la función de la molécula de histocompatibilidad en el desarrollo de enfermedad no ha sido aún dilucidado.

Varias hipótesis describen posibles mecanismos de la intervención de las moléculas HLA en enfermedad. En patologías con características autoinmunes existiría un antígeno propio reconocido por un LT que perdió la tolerancia. Este antígeno, que desarrolla una respuesta inmune, puede encontrarse en un órgano específico y ser así el blanco de ataque, o ser ubicuo y generar una enfermedad sistémica. La pérdida de tolerancia a un autoantígeno puede generarse por la activación de un LT que reconoce un antígeno parecido que proviene de un agente infeccioso. Esta hipótesis, que se denomina “mímica molecular”, ha sido evidenciada en un estudio de queratitis estromal herpetiforme, en el que se encontró el epitope mimetizado por el virus del herpes en un modelo murino [64]. Una hipótesis alternativa, surge a partir de la teoría de la selección clonal. De acuerdo con la misma, el timo selecciona negativamente a los LT que reconocen péptidos propios con gran afinidad. Aquellos clones T que tienen la capacidad de reconocer antígenos propios no son deletados si estos péptidos propios no son presentados en el timo durante la ontogenia T.

La asociación HLA-enfermedad también puede ser negativa, es decir que el alelo en cuestión se encuentre en menor proporción en los individuos enfermos que en los sanos. En este caso se encuentra un RR menor que uno. Un ejemplo de esto sucede en la diabetes mellitus de tipo I (IDDM) donde el haplotipo DQA1*0102-DQB1*0602 confiere protección [65]. Esta enfermedad (una de las asociaciones HLA-enfermedad más estudiadas) es una autoinmunidad determinada por factores genéticos y ambientales. La herencia de la susceptibilidad parece ser poligénica y está estrechamente asociada al HLA [66]. La clara asociación con el HLA y la disponibilidad de modelos animales

espontáneos como el ratón NOD (*non obese diabetic*), hacen de la diabetes el primer candidato en el entendimiento de la función del HLA en la patogénesis de la enfermedad. Tanto en el hombre como en el ratón, ésta se asoció con la posición 57 de la cadena β de la molécula DQ en humanos e I-A en ratón. La susceptibilidad está relacionada con aminoácidos neutros en esta posición (serina, alanina o valina) y la resistencia asociada al ácido aspártico en la misma posición. Estudios realizados en gemelos muestran una concordancia del 35-50% [67], en la cual hay que tener en cuenta que pueden existir diferencias en los repertorios de TCRs e Igs causadas por los rearrreglos al azar de genes. Esto demuestra que los factores ambientales son necesarios para el desarrollo de la enfermedad en los individuos predispuestos genéticamente. Estudios más recientes asociaron la IDDM a diferentes combinaciones de antígenos DR-DQ. La mayor susceptibilidad se encuentra en individuos heterocigotas DR3, DQ2/ DR4, DQ8, mostrando una mayor asociación que los individuos homocigotas DR3, DQ2 ó DR4, DQ8. Esto podría explicarse debido a que la susceptibilidad estaría relacionada con la molécula DQ α *03, DQ β *0201 que se expresa por transasociación de las cadenas α y β de los haplotipos del DR3-DQ2 (DRB1*03-DQA1*0201-DQB1*0201) y el DR4-DQ8 (DRB1*04-DQA1*03-DQB1*0302). También se observó la asociación con determinados subtipos de DR (DRB1*0405), los cuales combinados con los DQ2 y DQ8 confieren el máximo de susceptibilidad. Una hipótesis es que la susceptibilidad está dada por el antígeno DQ8 y que el DR4 confiere diferentes grados de protección. De esta manera, ciertos alelos DR4 (0405, 0401 y 0402) confieren una mínima o nula protección y otros DR4 (0404, 0403 y 0406) confieren una máxima protección [68].

Hepatitis autoinmune

A comienzos de la década del 40 se sospechaba que las diferentes etiologías de la cirrosis hepática eran el abuso de alcohol, la deficiencia alimentaria, la intoxicación con metales pesados o una obstrucción biliar ocasionada por una infección causada, presumiblemente, por el agente que inicia la hepatitis aguda infecciosa. A fines de esta década se definía

como hepatitis crónica activa (HCA) a la prolongación de una hepatitis sintomática por más de cuatro meses [69]. En el año 1950 Waldenström describió lo que hoy en día se designa como hepatitis autoinmune (HAI) en un trabajo en el que presentaba casos clínicos de HCA en los que predominaban mujeres adolescentes, con rasgos endocrinos como nevo arácnico, acné, amenorrea, y un incremento de γ -globulina atribuido a una infección viral persistente [70]. Kunkel y Zimmerman en forma independiente, describen la aparición de hipergamaglobulinemia en pacientes con HCA [71, 72]. En 1955 se demostró la asociación del fenómeno de células de lupus eritematoso (LE) con pacientes con HCA lo que llevó a Mackay a proponer el término de hepatitis “lupoide” [73, 74]. El test de células LE (lupus eritematoso) indicaba la existencia de anticuerpos anti-núcleo (ANA). En 1963 Holborow et al. desarrollaban la técnica de inmunofluorescencia para detección de estos anticuerpos mostrando la primera evidencia serológica de autoinmunidad en pacientes con HCA aún con LE negativo [75]. Otro de los autoanticuerpos detectados en pacientes con HCA, fue el anti-músculo liso (ASMA) [76], dirigido contra filamentos de actina del citoesqueleto [77]. Estos dos anticuerpos son los que actualmente definen la HAI de tipo I. Por otra parte la presencia de anticuerpos anti-LKM 1 (microsomias de hígado y riñón) define la HAI de tipo II [78].

La HCA era reconocida como una única entidad. A mediados de la década del 60, el descubrimiento de que el antígeno australiano (HBsAg) se encontraba asociado a la infección con el virus de la hepatitis B marcó una nueva etapa en la historia de la HCA. Se observó HBsAg en una alta proporción de pacientes con HCA. Tanto este antígeno como el HBcAg podían encontrarse en hígado por inmunohistoquímica. Estos hallazgos demostraban la etiología infecciosa del virus HBV y definían un nuevo grupo basado en la presencia del antígeno HBsAg, el cual se denominó HCA-HBV. Posteriormente, el descubrimiento del virus de la hepatitis C explicó la gran mayoría de los casos de HCA denominada criptogénica.

La biopsia de hígado fue implementada a partir de 1939 para detectar cronicidad en hepatitis aguda viral. En HCA el análisis de biopsias hepáticas indica macroscópicamente,

cirrosis macronodular. Microscópicamente se observa un proceso crónico inflamatorio caracterizado por fibrosis, infiltrado de células plasmáticas y desorganización del parénquima hepático. El rasgo histológico más distintivo es la actividad inflamatoria y la necrosis celular a nivel del lobulillo hepático. Este proceso comienza en la periferia del lobulillo hepático hasta llegar al espacio porta. A dicha histología propia de la HCA Popper et al. la denominaron “peacemeal necrosis” [79].

A partir de estas características se definía a la HAI como una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por inflamación hepática severa que en ausencia de tratamiento evoluciona hacia cirrosis, falla hepática y muerte. Las características más importantes de la HAI son la hipergamaglobulinemia, el aumento de transaminasas y la producción de autoanticuerpos.

En la argentina la HAI es la causa mas frecuente de hepatitis crónica en edad pediátrica.

Clasificación de las HAI

La HAI que se presenta con mayor frecuencia en nuestro país es la de tipo 1 (“lupoide” o anti-actina positiva), la cual está caracterizada por la presencia de anticuerpos contra antígenos del músculo liso (ASMA) y/o anticuerpos anti-núcleo (ANA). La detección de anticuerpos anti-actina puede ser llevada a cabo por medio de la técnica de inmunofluorescencia [77]. Se descartan anticuerpos contra tubulina y filamentos intermedios no específicos de HAI. En la experiencia de la Clínica Mayo (Rochester, USA), el 70 % de los pacientes con HAI tipo 1 son seropositivos para el ASMA, 52 % para el ANA y 29 % presentan el fenómeno LE [80, 81]. También se han detectado otros autoanticuerpos dirigidos hacia mitocondrias (AMA) en un 18 % de los pacientes, pero sólo un 12 % supera un título de 1:160[80]. Anticuerpos contra ADN doble cadena se detectan en el 64 % de los pacientes con HAI de tipo 1, ANA positivos.

La HAI tipo 2 está definida por la presencia anticuerpos anti-microsomas de hígado-riñón (LKM) y la ausencia de ASMA y ANA [78]. En pacientes con HAI, inclusive en aquellos

seronegativos para ASMA, ANA y LKMI, también pueden detectarse otros autoanticuerpos relacionados con el hígado. Los más característicos están dirigidos contra la lipoproteína específica de membrana de hígado[82], el receptor de la asialoglicoproteína de hepatocito (ASGP-R) [83], el antígeno soluble de hígado (SLA), el antígeno citosólico de hígado, el antígeno de hígado-páncreas y el antígeno de 60 kD de la membrana plasmática del hepatocito.

Aspectos clínicos, de laboratorio e histológicos de la HAI

El diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante estudios clínicos, serológicos, bioquímicos, de marcadores virales y de otros factores etiológicos. La expresión clínica de la HAI puede ser asintomática o sintomática. Estudios realizados en población anglosajona mostraron que aproximadamente un 70 % de los pacientes son mujeres, con un rango de edades muy amplio, desde unos pocos meses hasta los 80 años con un promedio de edades que está dentro de la tercer década de vida.

Los síntomas que presenta esta enfermedad son fatiga, generalmente acompañada de ictericia, dolores abdominales en el cuadrante medio superior derecho, artralgias, picazón y fiebre. La fiebre sin razón aparente es uno de los síntomas más tempranos. Las anomalías físicas que se observan con mas frecuencia son hepatomegalia, angioma arácnico, esplenomegalia, ascitis y encefalopatía hepática [80]. En más del 40 % de los pacientes se manifiestan enfermedades extrahepáticas, siendo la enfermedad tiroidea la más común (23 %) [80]. El 20 % de los pacientes con HAI que presentan anticuerpos contra tiroglobulina en suero, un 50 % desarrollarán una enfermedad tiroidea. Otras enfermedades extrahepáticas que se encuentran en menor frecuencia son colitis ulcerosa crónica, artritis reumatoidea, sinovitis, anemia perniciosa entre otras. Un 8 % de los pacientes presentan dos o más enfermedades extrahepáticas[84].

El aumento de transaminasas y de gamaglobulina son las principales manifestaciones de laboratorio detectadas en la HAI. La concentración de aspartato transaminasa es cercana a

los 500 IU/l superando en algunos casos los 1000 IU/l, aunque este fenómeno también se observa en pacientes con hepatitis aguda viral, o en casos de hepatotoxicidad. El 90 % de los pacientes presentan hipergamaglobulinemia siendo este un importante marcador de la enfermedad y de la actividad inflamatoria, sin embargo la ausencia de este síntoma no es suficiente para descartar el diagnóstico de HAI. El aumento de gamaglobulina es originado por un aumento de inmunoglobulina sérica especialmente inmunoglobulina G. Dicho aumento no indica una respuesta específica [85]. La detección en suero de paraproteínas y anticuerpos contra antígenos de bacterias y virus, reflejan la inoperancia del hígado en el secuestro de antígenos externos y la consiguiente detención en la producción de anticuerpos. Se demostró que estos anticuerpos interferían en el test de Elisa para el virus de hepatitis C dando como resultado falsos positivos [86]. Probablemente la hipergamaglobulinemia refleje la duración y la extensión del proceso inflamatorio en vez de la naturaleza inmune de la enfermedad. El aumento de la bilirrubina se presenta en 83 % de los pacientes pero la mayoría no muestra una ictericia clínica. La fosfatasa alcalina sérica se encuentra elevada en 81 % de los pacientes, aunque sólo en el 33 % duplica los valores normales y en el 19 % los cuadriplica [87].

El rasgo histológico más sobresaliente es la actividad inflamatoria y la necrosis de células del hígado que parecen erosionar el lobulillo hepático. Este tipo de lesión, que Popper denominó, “peacemeal necrosis”, se describe como una necrosis erosiva de hepatocitos que rodean el área portal constituyendo el límite del lóbulo, con infiltrados de linfocitos en la zona portal y periportal [79]. Se observa, además, una hepatitis lobular con gran infiltrado de células plasmáticas y la formación de rosetas de células hepáticas [88].

Tratamiento

La severidad y el mal pronóstico de la HAI fueron demostrados en estudios en los que sólo una minoría alcanzaba los diez años de sobrevida. El hecho que en 1990 un 95 % de los pacientes en ausencia de cirrosis supera los cinco años de sobrevida, denota una mejoría en el diagnóstico y una eficacia en el tratamiento [85]. Se observó que pacientes

con HAI tenían mejor sobrevida a los cinco años que pacientes con cirrosis criptogénica (87 % contra 65 %) [89]. Se ha sugerido que no hay razones para un tratamiento diferencial entre los diferentes subgrupos de HAI, ya que están excluidas las infecciones con virus hepatotrópicos. El tratamiento inmunosupresivo es requerido para todos los subgrupos serológicos de HAI, puesto que la remisión espontánea es poco frecuente. Luego de iniciado el tratamiento se observa una remisión en el 60-80 % de los pacientes[90]. La prednisona y prednisolona son los corticoesteroides clásicos usados como primera línea en la terapia. También pueden combinarse con azatioprina, la cual debe añadirse desde el inicio de la terapia. El tratamiento mejora los síntomas, causa la disminución de la actividad transaminasa, mientras que la hipergamaglobulinemia disminuye más lentamente. En general la remisión ocurre en los primeros 3 meses de iniciado el tratamiento, aunque el tratamiento puede extenderse entre 2 y 4 años.

Inmunogenética

Mackay y Morris, en 1971, describieron la primera asociación de la HAI con los antígenos HLA-A1 y -B8 [91]. Posteriormente, un estudio más amplio, confirmó la asociación del antígeno B8, encontrándose en 69 % de los pacientes comparado con 24 % en el grupo control. El riesgo relativo calculado fue de siete [92]. En poblaciones alemanas se obtuvieron resultados similares, el antígeno B8 estuvo presente en un 82 % de los pacientes contra 19 % de los controles con un riesgo relativo de 25 [93]. En 1977 Opelz y col. descubrieron, por primera vez, la asociación con antígenos HLA de clase II Dw3 [94]. Esta asociación era más fuerte que con el HLA-B8 por lo que supuso entonces que esta última era causada por el desequilibrio de ligamiento que existe entre estos dos loci. El primer estudio que definió los antígenos DR asociados se realizó en el Séptimo Taller Internacional de Histocompatibilidad. Como era de esperar el antígeno DR3 estaba incrementado en los pacientes con HAI y se presentaba con una fuerte asociación en aquellos que tenían un alto título de ASMA [95]. Los antígenos de clase I B12 y de clase II DR5, se presentaban con una frecuencia menor en pacientes que en los controles. En 1980 Mackay y Tait estudiaron un grupo de 43 pacientes con HA confirmando el aumento

de la frecuencia del DR3 y la disminución de las frecuencias de los antígenos DR2 y DR5 [96]. También se observó la disminución del antígeno B12 pero la misma no era explicable por desequilibrio de ligamiento con el DR2 o el DR5. Otros estudios realizados en caucásicos mostraban una fuerte asociación con el haplotipo A1-B8-DR3, especialmente en aquellos pacientes con altos títulos de ASMA y ANA. EL análisis realizado en el Octavo Taller Internacional de Histocompatibilidad mostró que se podía subdividir a los pacientes según la edad de comienzo de la enfermedad [97]. Así, los pacientes que mostraban los primeros síntomas antes de los treinta años tenían un fenotipo diferente a aquellos en que el inicio ocurría a mayor edad. El subgrupo de comienzo temprano era el que estaba fuertemente asociado al haplotipo A1-B8-DR3. Por otro lado se vio que la disminución del antígeno B12 se daba en el subgrupo de comienzo tardío (mayor a 30 años) y que también el DR7 se encontraba disminuido, probablemente como consecuencia del desequilibrio de ligamiento. En este subgrupo el B27 y el Cw1 se encontraban aumentados.

En un estudio familiar se vio que los antígenos B8 y DR3 se encontraban en el mismo cromosoma, demostrando formalmente que conformaban un haplotipo [96]. Ya que el haplotipo A1-B8-DR3, se encontraba asociado en menor grado esto sugería que la susceptibilidad se encontraba en la región B/DR, por lo que se decidió estudiar otros loci cercanos a esta región. En particular se eligió el locus dialélico de la glioxilasa, que se encuentra cercano al locus DP. Los dos alelos, GLO1 y GLO2 se encontraron en igual frecuencia que en los controles, descartando esta posibilidad [98].

En los últimos ocho años se han publicado gran cantidad de trabajos describiendo asociaciones HLA con la HAI de tipo I, mostrando en general cierta concordancia. Los estudios realizados en poblaciones caucásicas muestran una asociación primaria con el haplotipo B8-DR3 y una asociación secundaria (cuando excluimos los individuos con este haplotipo) con el antígeno DR4 [96, 99-101]. En la población japonesa de pacientes con HAI se observó una asociación primaria con el DR4 y con el DR2 en pacientes DR4 negativos [102, 103].

Doherty et al. utilizaron la genotipificación con el objetivo de analizar otros loci que puedan conferir una asociación más fuerte e investigar la existencia de determinantes comunes entre los dos antígenos asociados a la HAI [104]. El estudio de los loci HLA-DRB3, -DQA1 y -DQB1 mostró una asociación con el haplotipo DRB1*0301-DRB3*0101-DQA1*0501-DQB1*0201 y secundariamente con el DRB1*0401. Estos datos demostraron que el locus DRB1 estaba más fuertemente relacionado con la enfermedad que los loci DQA1 y DQB1. Analizando las secuencias de los alelos asociados se observó que el aminoácido lisina en la posición 71 de las cadenas DR β (en los alelos DRB1*0301, DRB1*0401 y en casi todos los DRB3) se encontraba en el 94 % de los pacientes comparado con un 64 % de los controles. Un segundo estudio realizado por el mismo grupo de investigadores en la Clínica Mayo, confirmó la asociación con la Lis 71 [105], reafirmando dicha hipótesis. Si bien en Japón la enfermedad también se encuentra asociada al DR4, el subtipo más frecuente fue el alelo DRB1*0405, que no posee lisina en la posición 71 [106]. De este modo, se publicaron dos hipótesis excluyentes, referidas a la cadena DR β , una basada en la lisina 71 [104] y otra que proponía que la susceptibilidad a la HAI estaba correlacionada con la presencia de un aminoácido básico en la posición 13. Esta última hipótesis se basa en el hecho de que en pacientes japoneses con HAI, el 88,7 % poseían el subtipo HLA-DR4 y que el resto de los pacientes tenían el antígeno DR2 [106], ambos subtipos son los únicos que poseen un aminoácido básico en la posición 13 de la cadena DRB1, His en los DR4 y Arg en los DR2 [107].

Los estudios realizados en nuestro laboratorio mostraban una particular diferencia con los ya publicados. Por un lado encontramos que grupos, con edad de comienzo de la enfermedad diferente (pediátricos y adultos), se asociaban a diferentes antígenos. Así los pacientes con HAI que iniciaban la enfermedad después de los 16 años y presentaban alguna manifestación extrahepática, mostraban una asociación con los antígenos DR4 y HLA-A11 [108], mientras que en los pacientes que tenían el primer episodio antes de los 16 años (pediátricos) mostraban una fuerte asociación con el antígeno DR6, en especial

con el alelo DRB1*1301 [109]. Estos datos no concuerdan con los discutidos previamente a pesar de que la historia genética sea muy similar.

La otra posibilidad que existe es que los antígenos asociados sirvan como un simple marcador del verdadero locus de susceptibilidad. Siendo los loci DRB los más fuertemente relacionados con la enfermedad, podría ser que otros loci cercanos a este sean los responsables. El análisis de la expresión de los genes del complemento que mapean en la región de clase III cercana al DRB mostró que un alto porcentaje de pacientes tenía el gen deletéreo y no expresaban C4A ó C4B [110-112]. A pesar de esto, el riesgo que confieren estos genes es menor al de los loci DRB. Como estos genes muestran un alto desequilibrio de ligamiento con el DRw52, esta sería la posible causa de su asociación.

Los estudios realizados hasta el momento indicarían que la susceptibilidad estaría dada por los loci DRB que muestran la mayor asociación, aunque no se haya encontrado concordancia en las diferentes poblaciones. No puede descartarse la existencia de otros factores etiológicos que ayuden a comprender dicha asociación.

Teoría del disparo viral

La enfermedad autoinmune es el resultado de la pérdida de la autotolerancia y de la consecuente destrucción de tejidos propios. Basados en datos clínicos y de laboratorio de estas enfermedades se han propuesto diversos mecanismos que actuarían en el inicio de una enfermedad autoinmune. La infección viral puede llegar a desencadenar o exacerbar la respuesta autoinmune. La destrucción de un tejido por una infección, la liberación de autoantígenos y el aumento de la actividad coestimuladora es una de las posibles causas. Otra hipótesis habla del mimetismo de un determinante propio por uno viral despertando así clones de linfocitos T auto-reactivos.

El inicio de la HAI estaría vinculado a algún factor que desencadene la enfermedad en un individuo genéticamente susceptible. El disparo inicial ha sido uno de los objetivos

primordiales de estudio de los últimos años. El principal candidato es la infección por el virus de la hepatitis A (HAV). Este virus es el agente que produce comúnmente hepatitis aguda en chicos, muchas veces subclínica. Se ha observado que en un 6-10 % de los casos, los pacientes presentan una forma bifásica, donde el episodio inicial dura de unas 4 a 5 semanas. La recaída mimetiza la fase aguda de la infección y en total ambos episodios pueden durar entre 16 y 40 semanas [113].

Vento et al. realizaron un seguimiento de 58 individuos, parientes en primer y segundo grado de pacientes con HAI. Estudiaron marcadores serológicos para varios virus hepatotrópicos; para autoanticuerpos ANA, anti-actina (AAA), anti-LKM-1 y contra el receptor de la asialoglicoproteína (ASGP-R). Por otro lado analizaron la función de linfocitos T (LT) inductores de la supresión, específica para el R-ASGP, viendo que en todos los pacientes y en algunos de los individuos estudiados se observaba un defecto en estas células. Tres de estos individuos sufrieron una infección por HAV. Dos de ellos, que poseían el defecto en los LT inductores de supresión, desarrollaron una HAI con los típicos rasgos histológicos y de autoanticuerpos [114]. Aunque no se definió qué clase de defecto era, lo importante es que siguiendo a la infección con HAV se desencadenó una HAI. Existen ya varios trabajos que describen el inicio de una HAI luego de una infección con HAV [113-116], los cuales representan una sugerencia de su posible papel en la etiopatogenia de la HAI.

En otras enfermedades autoinmunes experimentales se ha detectado el antígeno que mimetiza el autoantígeno y que sería el que desencadena la enfermedad. En la queratitis estromal herpetiforme, una reciente investigación, ha encontrado en un modelo murino el epitope mimetizado por un virus. Si se deleta el epitope en un virus mutante (el cual sigue manteniendo su capacidad infectiva), este deja de producir la enfermedad autoinmune, demostrando de forma clara que la mímica molecular tiene un papel muy importante en la patogénesis de esta autoinmunidad [64]. Esta es la primer prueba directa que el mimetismo molecular puede desencadenar una reacción autoinmune.

OBJETIVOS

El polimorfismo de los loci HLA puede regular la respuesta inmune contra diferentes enfermedades. Este mismo polimorfismo se encuentra involucrado en la respuesta de rechazo a un órgano transplantado. Asimismo, se han descripto más de 500 enfermedades asociadas a estos loci. Con estos antecedentes, conocer el polimorfismo en una población autóctona se hace imprescindible para cualquier estudio relacionado con trasplantes o asociaciones a enfermedades de etiología autoinmune. Este mismo polimorfismo, uno de los más extensos encontrados en vertebrados, los hace una herramienta fundamental en estudios evolutivos y de migraciones humanas.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1. Descripción del polimorfismo alélico y haplotípico de los loci DRB1, DQA1 y DQB1 y distribución de frecuencias en una muestra de la población de la ciudad de Buenos Aires y en dos poblaciones indígenas de Orán, Salta.
2. Estudio del desequilibrio de ligamiento de estos loci en la población de la ciudad de Buenos Aires.
3. Análisis filogenético de las tres poblaciones estudiadas y sus relaciones con otras poblaciones de diferentes regiones y orígenes étnicos, mediante el uso de componentes principales y dos tipos de métodos diferentes: UPGMA y el N-J.
4. Estudio de la asociación del sistema HLA a una enfermedad autoinmune: la HAI.

MATERIALES Y METODOS

Individuos sanos de la Ciudad de Buenos Aires y de Orán, Salta.

Para estos estudios se obtuvo una muestra de 208 individuos, residentes en la ciudad de Buenos Aires a la que se denominó panel normal. En la ciudad de Orán, Salta, se obtuvieron de dos poblaciones aborígenes, una muestra de 19 individuos wichis y otra de 56 chiriguano. A cada uno de estos individuos se les realizó una extracción de sangre para la obtención de ADN.

Panel control

La muestra control de la población de la Ciudad de Buenos Aires se obtuvo de individuos de nuestro Servicio (Laboratorio de Inmunogenética) y de donadores de sangre del Servicio de Hemoterapia, ambos del Hospital de Clínicas José de San Martín. A cada persona se le realizó un cuestionario para conocer, su origen étnico y antecedentes familiares con enfermedades genéticas o de etiología autoinmune. El criterio de inclusión fue que el individuo tuviera padres caucásicos argentinos que sean residentes de la Ciudad de Buenos Aires o suburbios y abuelos caucásicos argentinos, italianos o españoles y no tuviera antecedentes de algún tipo de enfermedad genética o autoinmune. Estos criterios tienen como objetivo disminuir el error de muestreo restringiendo la población a estudiar a las principales etnias que poblaron nuestra ciudad y, por otro lado, que se trate de una población "genéticamente" sana. Asimismo, ninguno de los individuos tienen entre sí alguna relación de parentesco. Se obtuvo ADN de 208 individuos de Buenos Aires que reunieran los criterios de inclusión.

Indios Chiriguanos y Wichi

Como parte de un trabajo colaborativo con el Hospital de Orán, Salta, se obtuvo sangre de 19 indios wichis de la reserva denominada “territorio fiscal” ubicada cerca de la ciudad 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-Tucanoan, a dicha subfamilia pertenecen los Tobas. La mayoría provienen de la región de Embarcación.

La comunidad chiriguana ubicada en las afueras de Orán, no llega a ser tan cerrada como la Wichi. Pertenecen al grupo lingüístico Ecuatoriano-Tucanoan, a la subfamilia Tupi-Guaraní. De esta población se obtuvo una muestra de 56 individuos con el mismo criterio de inclusión que para el panel normal.

Pacientes con HAI

Hepatitis Autoinmune

Los pacientes con HAI fueron derivados de seis diferentes centros de hígado (tabla 1). Los criterios de inclusión respecto del origen étnico, fueron los mismos que los del panel normal a excepción de que cada paciente presentara una HAI de tipo I definida.

Los estudios bioquímicos e histológicos para determinar la enfermedad fueron realizados en cada centro, donde se examinó al paciente clínicamente en busca de rasgos típicos de la HAI como un cuadro de hepatitis no resuelto, evidencias de cirrosis, insuficiencia hepática, ascitis hemorrágica digestiva, transaminasas mayores a los valores normales, gamaglobulina mayor a 1,5 veces el límite superior normal. También se analizaron los anticuerpos ANA y ASMA (específico contra F actina), definiendo como positivo un título mayor a 1:80. La positividad de uno o ambos anticuerpos definen la HAI de tipo I.

Histológicamente la necrosis periportal con o sin necrosis en puente, inflamación portal o fibrosis definen la histopatología de la HAI de tipo I.

CENTRO:

Ciudad:

Hosp. de Clínicas "José de San Martín"	Buenos Aires
Hosp. Nacional de Pediatría "JP Garrahan"	Buenos Aires
Hosp. de Niños "R Gutiérrez"	Buenos Aires
Hosp. Nacional "A Posadas"	Buenos Aires
Hosp. Municipal "FJ Muñiz"	Buenos Aires
Hosp. Italiano	Buenos Aires

Tabla 1

Centros de la ciudad de Buenos Aires que colaboraron con estos estudios.

Tipificación de alelos de los loci HLA-DRB1, DRB3, DQA1 y DQB1 por oligonucleótidos específicos de secuencia (SSOP)

Para la oligotipificación de cada uno de los loci de HLA de clase II se realiza una amplificación específica del exón 2 (exón más polimórfico) y la posterior hibridación con sondas específicas de secuencia. Luego se realiza un cuidadoso análisis del patrón de sondas positivas y negativas para poder determinar los alelos del individuo estudiado. En general, todos los oligonucleótidos usados como sondas o primers así como también el protocolo de hibridación son los obtenidos del XI y XII Taller de Histocompatibilidad.

Oligotipificación de los loci HLA-DRB

Para la tipificación de los genes HLA-DRB (DRB1, DRB3) existen diferentes pares de *primers* específicos para cada locus que amplifican el exón 2. En el caso de DRB1, la estrategia es dividir la tipificación en subgrupos y así simplificar el trabajo y el análisis de la oligotipificación.

HLA-DRB1

El primer paso es una amplificación con *primers* que aparean con secuencias homólogas para todos los alelos de los loci DRB, DRB genérica (tabla 2). Dicho producto se lo hibrida con una veintena de sondas que reconocen las especificidades correspondientes a las descritas por serología (DR1, DR2, DR3...,DR14). A esta primera determinación se la denomina tipificación genérica. El segundo paso es la amplificación específica de cuatro diferentes grupos. Los *primers* que definen cada grupo son los que aparean en el extremo 5' (tabla 2), entre los aminoácidos 5-14, con secuencias específicas para cada uno de ellos. Cada uno de éstos es hibridado con un juego de sondas con el cual se pueden definir todos los alelos (tabla 3). Las secuencias de las sondas y sus especificidades se encuentran al final de Materiales y Métodos en el capítulo Sondas.

• DRB GENERICA Posición				
2DRBAMP-A	EXON-2 2-8	CCCCACAGC A CGT TTC TTG		5' cod
	2-8	----- C--		
2DRBAMP-B	87-94	CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT A	complementaria	
• DR1-DRB1				
2DRBAMP-1	EXON-2 8-14	TTC TTG TGG CAG CTT AAG TT		5' cod
2DRBAMP-B	EL MISMO QUE LA AMPLIFICACION GENERICA			
• DR2-DRB1				
2DRBAMP-2	EXON-2 7-13	TTC CTG TGG CAG CCT AAG AGG		5' cod.
2DRBAMP-B	EL MISMO QUE LA AMPLIFICACION GENERICA			
• DR4-DRB1				
2DRBAMP-4	EXON-2 6-13	GT TTC TTG GAG CAG GTT AAA C		5' cod.
2DRBAMP-B	EL MISMO QUE LA AMPLIFICACION GENERICA			
• DR52-DRB1				
2DRBAMP-3	EXON-2 5-12	CA CGT TTC TTG GAG TAC TCT AC		5' cod.
2DRBAMP-B	EL MISMO QUE LA AMPLIFICACION GENERICA			
2DR86AMP-GR compl.*	86-92	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC		
2DR86AMP-VR compl.*	86-92	CTG CAC TGT GAA GCT CTC CA		

Tabla 2.

Primers genéricos para los loci DRB y específicos para los grupos DR1, DR2, DR4 y el grupo asociado al DR52 que abarca los DR3, DR5 (DR11 y DR 12), DR 6 (DR 13 y DR 14) y el DR 8.

Grupo 1: alelos del DR1	9 Sondas
Grupo 2: alelos del DR2	19 Sondas
Grupo 3: alelos del DR4	18 Sondas
Grupo 4: alelos del DR3, DR5, DR6 y DR8 (llamado también grupo asociado al DR52)	52 Sondas

Tabla 3.

Número de sondas con que se hibrida a cada grupo.

Existen algunas combinaciones de alelos de un mismo grupo que tienen el mismo patrón de hibridación. Si esta ambigüedad comprende dos alelos que difieren en el aminoácido 86 (donde el aminoácido Gly o Val se presenta en el 99 % de los alelos), entonces se puede usar este polimorfismo para realizar una amplificación específica de cada alelo. Se usa un *primer* específico de grupo 5' y un par de *primers* 3' (estos últimos por separado), 2DRB86-AMP-GR y 2DRB86-AMP-VR (tabla 2), que aparean en el sitio polimórfico que existe en el codón 86 (Gly o Val), obteniendo así un producto de cada alelo por separado. Luego se hibridan los dos productos de PCR (Gly o Val) con las sondas que dieran positivas en la grupo-específica, pudiendo definir así el alelo amplificado.

HLA-DRB3

La amplificación específica de los este locus se lleva a cabo con *primers* específicos, que amplifican también el exón 2. Luego se realiza la hibridación con las sondas correspondientes para este locus y así poder definir todos los alelos. Las secuencias de las sondas y sus especificidades se encuentran al final de Materiales y Métodos en el capítulo Sondas.

Alelos de HLA-DRB3 15 Sondas (mínimas recomendadas: 5)

Oligotipificación de HLA-DQA1 y HLA-DQB1.

La tipificación de estos dos loci utilizan la misma estrategia: amplificación del exón 2 y la respectiva hibridación. DQA1 contiene alelos que difieren en el péptido señal (exón 1), DQA1*0501A, DQA1*0501B, DQA1*0101 y DQA1*0104 y en el exón 3

(DQA1*0301 y DQA1*0302). Cada locus se hibrida con las sondas necesarias para discernir entre todos sus alelos (tabla 4). En nuestro caso sólo se tipificó al exón 2, el más relevante en la presentación de péptidos. Por consiguiente, a los alelos DQA1*0501A y DQA1*0501B se los nombra como DQA1*05, el alelo DQA1*0104 queda incluido con el DQA1*0101 y a los alelos DQA1*0301 Y DQA1*0302 se los nombra como DQA1*03. Las secuencias de las sondas y sus especificidades se encuentran al final de Materiales y Métodos en el capítulo Sondas.

Alelos de HLA-DQA1 (exón 2)	21 Sondas
Alelos de HLA-DQB1 (exón 2)	36 Sondas

Tabla 4.
Número de sondas con que se hibrida a cada grupo.

Métodos de extracción de ADN

Se utilizaron dos métodos de extracción de ADN a partir de sangre periférica: el método de fenol-cloroformo y el de *Salting-out*. Estos métodos fueron obtenidos de los protocolos del XI y XII Taller de Histocompatibilidad [117, 118].

Fenol-cloroformo:

REACTIVOS

Buffer de lisis de leucocitos: WCLB
10mM Tris-HCl (pH 7.6)
10mM EDTA (pH 8.0)
50mM NaCl

Buffer de lisis de glóbulos rojos: RCLB
10mM Tris-HCl (pH 7.6)

5mM MgCl₂
10mM NaCl

PCI (fenol Tris (pH 8.0)- alcohol isoamílico - cloroformo 75:1:24)

SDS al 10%

Proteínasa K, 10 mg/ml, disuelta en H₂O

Buffer TE
10 mM Tris-HCl (pH7.5)
1mM EDTA (pH8.0)

IAC
Alcohol isoamílico - Cloroformo (1:24)

Metodología

La extracción se realiza a partir de 10 ml de sangre periférica anticoagulada con 2 ml de EDTA 5% (pH8.0) en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Se le agrega un volumen igual de RCLB para la lisis de glóbulos rojos y se lo centrifuga a 1500 r.p.m. durante 5 min. Se descarta la fase acuosa sin tocar el pellet. Se realiza este paso de lisado de glóbulos rojos hasta obtener un pellet suficientemente limpio. Luego se resuspende el pellet en 3 ml de WCLB y se agregan 50 µl de 10 % SDS y 50 µl de la solución de proteínasa K. Se mezcla horizontalmente a 50 r.p.m. a 42° a 50° C durante toda la noche. Terminada la incubación se agregan 3 ml de PCI, se mezcla 10 min. con la mano hasta obtener una completa emulsión y se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 5 min. Se transfiere la fase acuosa a otro tubo de polipropileno de 15 ml y se hace una segunda extracción con PCI y luego una última con IAC. Se recupera la fase acuosa a la cual se le agregan 60 µl de NaCl 5M para obtener una concentración final de 0.1 M y 0.6 volúmenes de 100 % Isopropanol. Se mezcla por inversión hasta que se forme el precipitado. El ADN precipitado se lo recupera en un tubo plástico estéril con tapa de 5 ml, se lo lava 3 veces con 3 ml de Etanol 70 % y se deja secar. El precipitado se lo resuspende en Buffer TE de 0.1 a 1 ml dependiendo de la cantidad de precipitado que se haya obtenido. La concentración de ADN se la chequea en un gel de agarosa al 1 % teñido con Bromuro de

Etidio 0.5 µg/ml, comparándolo con un ADN patrón, o se le mide la absorbancia a 260 nm y se ajustó la concentración de ADN a 100µg/ml.

Micro método Salting-out:

REACTIVOS

Buffer PCR
50 mM ClK
10 mM Tris-HCl (pH 8.3)
2.5 mM Cl₂Mg

Buffer K
0.5 % NP 40
100 µg/ml Proteínasa K
Buffer PCR

Metodología

A 400 µl de sangre periférica anticoagulada con 80 µl de EDTA al 5 % (pH 8.0) se le agrega 1 ml de TE, se mezcla bien y se centrifuga 1 min. a 14000g. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet de células blancas. Este lavado se repite hasta obtener un pellet limpio al cual se le agrega 250 µl de Buffer K e incuba durante 1 hr a 55° C. A este lisado se le agrega 250 µl de NaCl 2,5 M, se mezcla bien y se centrifuga 10 min. a 14000 g. El sobrenadante se vuelca en otro tubo al que se le añade 1ml de Etanol 100 % y se mezcla por inversión hasta ver un precipitado. Se centrifuga 1 min. a 14000g y se descarta el sobrenadante. Se realizan 1 ó 2 lavados con 1 ml de Etanol 70%. Se deja secar el pellet 1 hr o 10 min. al vacío y se resuspende el ADN en 250 a 500 µl de dH₂O. La concentración de ADN se mide igual que en la extracción de fenol cloroformo.

Amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla se realiza en tubos de 0.2 ml de pared delgada. Los reactivos necesarios son:

dH₂O
Buffer 10 x
Cl₂Mg
dNTPs 10 x
• 25 mM dATP
• 25 mM dCTP
• 25 mM dGTP
• 25 mM dTTP

-Se usa de 0.1 a 0.5 µg de ADN genómico para una reacción de volumen final de 50 µl

ADN	0.1 a 0.5 µg
Buffer de PCR 10 x	5 µl
dNTPs 10 x	0.5 µl
<i>Primers</i>	25 picomoles de cada uno
Taq DNA polimerasa	1 unidad
dH ₂ O	hasta un volumen final de 50 µl

Programas de PCR

1 min. a 94°-96° C (desnaturalización de cadenas)

1 min. a T° de *annealing* (T° de apareamiento de los *primers*)

1 min. a 72° C (extensión de la cadena)

Estos tres pasos se repiten consecutivamente 30 a 35 veces

Antes de los ciclos se hace un paso de 5 min. a 94-96° C para desnaturalizar el ADN genómico y terminados los 30 ciclos se realiza un paso a 72° C por 5 min. para completar la extensión de las cadenas que hayan quedado sin terminar

Todos los reactivos usados para esta reacción son de PROMEGA.

Optimización de la reacción

Este programa puede ser variado de diferentes maneras para obtener la cantidad y pureza necesaria de producto de amplificación. El principal parámetro que se puede cambiar es la temperatura de *annealing* que controla la especificidad de unión del *primer*, dando como resultado una mayor pureza del producto amplificado. Al subir la temperatura aumentamos la especificidad pero disminuimos la eficiencia de amplificación que se obtiene por ciclo. Una variante es realizar 15 ciclos iniciales con una temperatura alta de *annealing* y obtener un alto grado de pureza y luego 15 ciclos con 2° C por debajo de la temperatura de *annealing* anterior y así obtener una masiva amplificación del producto puro inicialmente amplificado. Esta estrategia es la usada en nuestro laboratorio para la reacción de la mayoría de las reacciones.

Verificación del producto de PCR

Dos µls del producto de PCR se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en TBE 1x (0.045 M Tris-Borato, 0.001 M EDTA) con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml). Se controla el tamaño del producto comparándolo con un marcador de tamaño de origen comercial que produce bandas de a múltiplos de 100 bp. Además se examina la intensidad del producto equiparándola con un producto patrón, de esta manera se calcula cuanto hay que sembrar aproximadamente en las membranas para obtener una hibridación similar.

Hibridación

REACTIVOS

SSPE 30 x

- 4.5 M NaCl
- 0.3 M NaH₂PO₄
- 30 mM EDTA
- Se ajusta con NaOH a pH 7.4

SSC 20 x

- 3 M NaCl
- 0.3 M Citrato de Sodio

Dot blot (*siembra del ADN en puntos*)

El ADN amplificado, una vez analizado por electroforesis, se lo siembra en membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham). La cantidad a sembrar varía de 10 a 50 ng por *dot*, aproximadamente 2 a 5 µl del producto de PCR. Las membranas pueden rehibridarse hasta 3 veces, dependiendo de la cantidad de sondas a utilizar se sembrará el número necesario de membranas replicadas.

Procedimiento:

- Mojar las membranas en dH₂O por 10 min.
- Luego pasarlas a 10 x SSPE (o 2 x SSC) por 15 min.
- Secarlas a 60° C
- Sembrar 2 a 5 µl del ADN amplificado de acuerdo a un orden planificado (todas las membranas tendrán el mismo orden en las muestras)
- Dejarlas secar a temperatura ambiente
- Mojarlas en 0.4 N NaOH por 5 min.
- Luego pasarlas a 10 x SSPE (o 2 x SSC) por 10 min.
- Ponerlas en un papel de filtro (Whatman 3MM) para sacar el exceso de fluido

Para fijar covalentemente el ADN a la membrana, colocarlas entre hojas de papel de filtro y secarlas en una estufa a 80° C durante 1 hora. Alternativamente se las ilumina con luz U.V. de 254 nm durante 5 min.

Marcación radioactiva de la sonda

El oligonucleótido se marca con ATP[γ P³²], el cual se incorpora al extremo 5'. Este se lo puede detectar, exponiendo las membranas hibridadas a una película autorradiográfica.

Marcación con ATP[γ P³²] en 5'

REACTIVOS

10 x Buffer de Kinasa

- 0.5 M Tris-HCl (pH 7.6)
- 0.1 M MgCl₂
- 50 mM DTT

La reacción se realiza en un tubo tipo Eppendorf de 0.5 ml

Reacción

Sonda (SSO)	5-10 pm
10 x Buffer de Kinasa	2.5 μ l
[γ 32 P] ATP	30 a 100 μ Ci
T4 PNK	10 a 20 U
dH ₂ O	hasta 25 μ l

-Se incuba a 37° C durante 30 min.

-Se agrega 1 μ l de 0.5 M EDTA (pH 8.0) para detener la reacción

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Operon y Biosynthesis.

Hibridación

Se utilizaron tres métodos de hibridación. En un principio, no se usó TMAC lo que traía como consecuencia una gran cantidad de lavados de las membranas dependiendo de la sonda. La incorporación del TMAC solucionó, en parte, los lavados puesto que se podían lavar las sondas a una misma temperatura (si estas eran del mismo tamaño en pb). Aunque con ciertas sondas hubo que variar la temperatura para optimizar la hibridación.

Método con Cloruro de Tetrametilamonio (TMAC)

Soluciones

SSPE 30 x

- 4.5 M NaCl
- 0.3 M NaH₂PO₄
- 30 mM EDTA
- Se ajusta con NaOH a pH 7.4

SSC 20 x

- 3 M NaCl
- 0.3 M Citrato de Sodio

Denhardt 50 x

- 100 ml 2% PVP 40 (Polivinilpirrolidona) y 2% Ficoll 400
- Autoclavar a 120° C durante 10 min.
- Agregar 2 g de BSA (Fracción V)
- llevar a 200 ml de volumen final con dH₂O
- Guardar a -20° C, en alícuotas de 10 ml

TMAC 3M (Cloruro de Tetrametilamonio)

- 50 mM Tris-HCl (pH8.0)
- 3.0 M Cloruro de Tetrametilamonio
- 2 mM EDTA
- 0.1 % SDS

ADN de esperma de Salmón

Se disuelve 10 mg/ml de esperma de Salmón en 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA

El ADN se fragmenta pasándolo por jeringa y aguja, diez veces, usando cada vez agujas de menor calibre.

[opcional] pasarlo diez veces por agujas de cuatro diámetros diferentes de forma decreciente.

Se calienta a 95° C durante 5 min.

Se guarda a -20° C en alícuotas de 1 a 5 ml

Buffer de hibridación

- 50 mM Tris-HCl (pH8.0)
- 3.0 M TMAC
- 2 mM EDTA (pH 8.0)
- 5 x Denhardt
- 0.1 % SDS
- 100 µg/ml ADN de esperma de salmón

Hibridación

- Se incuba con 10 ml de solución de hibridación (por membrana de 4 cm x 7 cm) al menos 30 min. a 54° C
- En este tiempo se puede marcar la sonda, la que luego se agrega a la solución de hibridación
- Se incuba al menos 1 hr (y hasta 16 hrs) a 54° C

Lavados

- Lavar en 20 ml (por membrana de 4 cm x 7 cm) de 2 x SSPE o 2 x SSC, 0.1 % SDS a temperatura ambiente durante 10 min. dos veces para remover el exceso de sonda
- Luego 15 min. en solución TMAC 3M precalentado a 37° C
- Lavar las membranas con solución TMAC 3M precalentado a la temperatura recomendada para cada sonda (tabla 5), durante 30 min. (este lavado debe ser estrictamente controlado)

Número de bases de la sonda	Temperatura de lavado
18	59° C
19	60° C
20	61° C

Tabla 5.

Temperaturas de lavados según cantidad de bases de la sonda

Método alternativo sin TMAC 3M

Soluciones

Buffer de hibridación

- 6 x SSPE
- 5 x Denhardt
- 0.5 % SDS
- 100µg/ml de ADN de esperma de Salmón

Hibridación

- Prehibridar en 10 ml de Buffer de hibridación durante 1 hr a 42° C
- Agregar la sonda marcada e incubar a 42° C de 2 hrs a 16 hrs

Lavados

- 10 min. en 20 ml por membrana (de 4 cm x 7cm) de 2 x SSPE o 2 x SSC, 0.1 % SDS a temperatura ambiente
- Lavar con 20 ml por membrana de 6 x SSPE, 0.1 % SDS durante 10 min. a Td*, dos veces

*Td = 4 x (el número de CG que tenga la sonda) + 2 x (el número de AT)

Método alternativo de hibridación utilizado los últimos años en nuestro laboratorio

La hibridación se realiza sin TMAC utilizando el buffer de hibridación descrito en el método alternativo sin TMAC. Luego se agrega la sonda marcada (con cualquier de los métodos) y se hibrida durante 1 hr (y hasta 16hrs).

Lavados

- 10 min. en 20 ml por membrana de 2 x SSPE, 0.1 % SDS a temperatura ambiente
- 15 min. en solución TMAC 3M precalentado a 50° C
- Lavar las membranas con solución TMAC 3M precalentado a la temperatura recomendada para cada sonda* durante 15 min. (este lavado debe ser estrictamente controlado)

Detección de las sondas hibridadas

Autorradiografía de sondas marcadas con ATP[γ P³²]

- Las membranas se secan en papel Whatman 3MM para sacar el exceso de líquido
- Se las pone en bolsitas o en película autoadherente
- Se expone a película autorradiográfica durante 1 a 5 hrs.

Eliminación de la sonda para rehibridar la membrana

- Lavar con 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 % SDS a 70° C por 15 min., dos veces
- Analizar el lavado con una autorradiografía de 2 hrs de exposición

-Guardar la membrana a 4° C hasta su uso

Controles

Controles para PCR

-Cada grupo de muestras que se amplifica debe incluir tubos controles negativos. Para las amplificaciones genéricas (DRB1, DQA1, DQB1, DPA1 y DPB1) se puede usar un tubo con dH₂O y todos los reactivos de PCR. Estos son controles de contaminación

En las amplificaciones específicas de grupo se puede usar una muestra tal que ninguno de sus dos alelos pertenezca a dicho grupo.

Controles para la hibridación

-A cada membrana se le incluirá un ADN amplificado que sea positivo para la sonda y otro negativo, de forma tal de poder discriminar una reacción positiva, de otra inespecífica. El control positivo debería ser heterocigota para el grupo a amplificar y así tener un solo alelo que reaccione con la sonda (mínimo de intensidad posible de una reacción positiva). El control negativo debería diferenciarse en el mínimo de bases posibles, en la región donde pega la sonda, así la intensidad será la máxima posible de una reacción inespecífica (figura 6).

Ejemplo

60

DRB1*0101	GAG	CTG	GGG	CGG	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC	CTC	C
DRB1*1101	---	---	---	---	---	---	AG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T---
DRB1*1201	---	---	---	---	---	TC	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	A---
DRB1*1202	---	---	---	---	---	TC	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	T---

SSO 5703 G CCT GAT GAG GAG TAC TG

Para la sonda 5703 se puede elegir como control positivo el DRB1*1101 y como control negativo el DRB1*0101, que será mejor control que el DRB1*1201 o que el DRB1*1202.

Figura 6

Ejemplo de un control positivo óptimo para una hibridación.

Tipificación del alelo HLA-A11 por PCR-SSP

Para la detección de este antígeno se uso un par de primers específicos que aparean en 5' en el exón 2 y en 3' en el exón 3 amplificando únicamente los alelos HLA-A 11 [119]. Los primers son:

5' ACG GAA TGT GAA GGC CCA G
3' CTC TCT GCT GCT CCG CCG

La reacción se realiza en un volumen final de 12 µl con una concentración de Mg de 3 mM. El programa de termociclado tiene 10 ciclos con una temperatura de *annealing* de 67 C luego otros 15 ciclos a una temperatura de *annealing* de 64 C y por último 5 ciclos con una temperatura de *annealing* de 55 C. Todos los ciclos se realizaron con pasos de un minuto tanto para los 94 C de desnaturalización, para el *annealing* y para los 72 C de extensión.

Análisis estadísticos

Estimación de frecuencias

La frecuencia antigénica se obtuvo dividiendo el N antigénico, o sea el número de individuos positivos para el antígeno, por el número total de individuos analizados. Para la estimación de la frecuencia alélica, se utilizó el algoritmo de EM (*Expectation-Maximization*), que conduce a la estimación de la máxima verosimilitud (MLE, *maximum likelihood estimates*). La máxima verosimilitud es un método que aproxima muy bien a los parámetros de una distribución multinomial, en nuestro caso el parámetro a estimar es la frecuencia alélica. El algoritmo de EM es un método iterativo que aproxima a MLE, cada paso consiste en una estimación y en una maximización [120, 121]. De esta manera, con este método, se tiene en cuenta posibles alelos recesivos de cada locus, que originen un blanco. El N alélico se obtuvo suponiendo que los individuos homocigotas poseen el mismo alelo dos veces. Este número alélico se lo presentó únicamente a modo descriptivo. Las frecuencias haplotípicas se estiman también con el algoritmo de EM, bajo la suposición de que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg [122, 123]. Estas frecuencias se calcularon con el programa ARLEQUIN [124].

Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento mide el grado de asociación no al azar de alelos de diferentes loci en el mismo cromosoma. Se utilizaron dos medidas de ligamiento D y D' [123, 125, 126]:

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

donde x_i es la frecuencia observada del haplotipo i compuesto por dos alelos de frecuencias p_i y q_i .

Este valor va a depender de las frecuencias alélicas p_i y q_i , lo que dificulta la comparación con otros haplotipos o con otras poblaciones. En ciertos casos el valor D' se hace independiente de las frecuencias alélicas y sirve para hacer comparaciones, aunque no siempre es así [126].

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

donde D_{\max} es el menor valor de $p(1-q)$ ó $q(1-p)$ si $D > 0$, o el menor valor de $p \cdot q$ ó $(1-p) \cdot (1-q)$ si $D < 0$.

Estas medidas se calcularon con el programa ARLEQUIN.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

El alejamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg, en el que se estudia la hipótesis de que los genotipos observados son producidos por la unión al azar de gametas, fue analizado para cada locus con un test exacto, usando una cadena de Markov, modificado por Guo y Thomsom [127]. El análisis fue realizado con el programa ARLEQUIN.

Distancias génicas

Se usó la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards [128], la que asume que los cambios en frecuencias génicas son por deriva génica. Además no asume que los tamaños poblacionales se mantienen constantes en el tiempo.

Las distancias genéticas entre dos poblaciones arbitrarias 1 y 2, se calcularon a partir de las frecuencias alélicas como:

$$D^2 = 4 \sum_m [1 - \sum_i f_{1mi}^{1/2} \cdot f_{2mi}^{1/2}] / \sum_m (a - 1)$$

donde f_{1mi} y f_{2mi} son las frecuencias alélicas de un alelo i del locus m en las poblaciones 1 y 2 respectivamente; a es el número de alelos de cada locus.

Las distancias se calcularon a partir de una tabla de frecuencias alélicas de los loci DRB1, DQA1 y DQB1 para cada población con el programa de Felsenstein, PHYLIP [129].

Arboles filogenéticos

Para la construcción de los árboles se usó el programa de Felsenstein, PHYLIP . Este programa implementa el método de agrupamiento del vecino más próximo (N-J) de Nei y Saitou y el UPGMA (*Unweighted Pair-Group method with arithmetic mean*). El método de N-J no asume una tasa de evolución constante y genera un árbol sin raíz. El método de UPGMA asume una tasa de evolución constante, esto significa que las ramas del árbol no son de una longitud arbitraria. Se usó la técnica de remuestreo (*bootstrap*) para conferir validez estadística a cada grupo formado. Para cada árbol se realizaron 100 replicas de los datos originales (frecuencias alélicas).

Análisis multivariado

Componentes principales es un método que simplifica datos multivariados con la mínima pérdida de información. Casi todos los grupos de datos, formados por varias poblaciones con sus frecuencias génicas contienen cierta información redundante medida por la correlación que existe entre genes en un par de poblaciones. Componentes principales ofrecen un modo simple de análisis de las frecuencias génicas de un grupo de poblaciones. Para visualizar mejor el método se puede aplicar a un ejemplo de cinco poblaciones con cinco genes y sus frecuencias génicas. Graficando las frecuencias génicas de sólo dos genes, uno en la abscisa y otro en la ordenada de un diagrama cartesiano, las cinco poblaciones quedarán representadas como cinco puntos en el diagrama (figura 7). Se traza una línea recta usando el criterio de que la distancia a cada punto sea mínima y a esta recta se la denomina primer componente. Los puntos originales que representan las frecuencias génicas de cada población, pueden proyectarse sobre el primer componente principal, con una escala arbitraria (usualmente, elegida para que los puntos tengan una media igual a cero y una varianza igual a uno). Este primer componente nos muestra las similitudes en frecuencias de los dos genes analizados para las cinco poblaciones. De esta manera, encontramos similitudes, entre las poblaciones de Asia y Africa (ceranas en el primer componente) como también las de América y Australia.

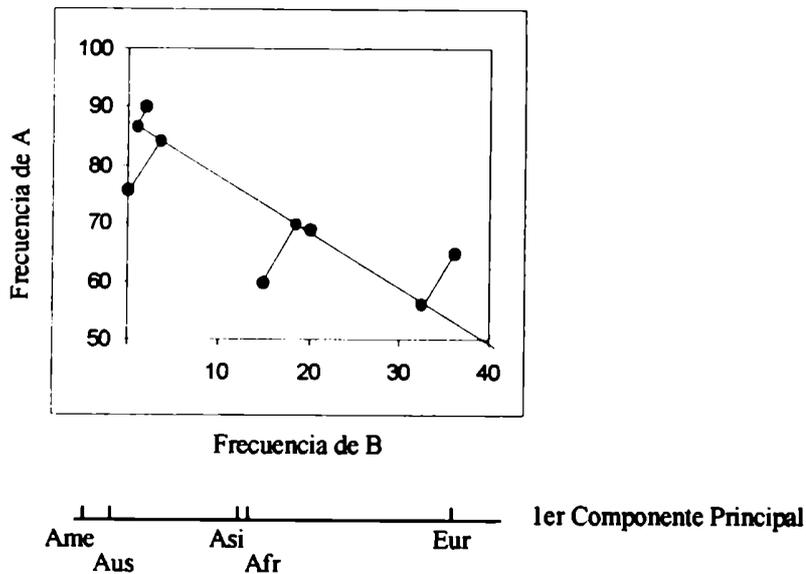


Figura 7

Diagrama donde se ubican cinco poblaciones según sus frecuencias para dos genes hipotéticos A y B. 1, Africa; 2, Asia; 3, Europa; 4, América; 5 Australia. Abajo se diagrama el primer componente principal, en donde los cinco nuevos valores para las poblaciones se obtienen proyectando los puntos con una línea perpendicular al primer componente.

Este procedimiento, puede realizarse en un gráfico con tres dimensiones (tres frecuencias de genes) y obtener de esta manera, un primer componente principal con el criterio anterior. Además, se puede obtener un segundo componente que va a ser ortogonal al primero utilizando el mismo criterio de minimizar la distancia a cada punto. Este segundo componente principal tendrá información que no es presentada en el primero. Siguiendo este procedimiento, se puede analizar sistemas con una gran cantidad de variables y obtener los componentes principales que sinteticen los datos. En general los primeros tres componentes principales pueden explicar de un 60 a 90 % de la varianza. Se usó el análisis de componentes principales para graficar en dos dimensiones los resultados de la

matriz de distancias genéticas entre poblaciones. El mismo se llevó a cabo con el programa STATISTICA 4.5, a partir de una matriz de correlaciones entre poblaciones, la que se calcula a partir de la de distancias, como $r = 1 - D$ (distancia genética) [130].

Medidas de asociación a enfermedad

Riesgo relativo y fracción etiológica

Riesgo relativo: es la razón entre el riesgo de padecer la enfermedad en una población con el marcador y el riesgo en la que es negativa para el marcador. Se calcula de la siguiente forma:

A partir de una tabla de 2 x 2,

	Con el marcador	Sin el marcador
Enfermos	a	b
Sanos	c	d

El riesgo relativo se obtiene de,

$$RR = \frac{a/c}{b/d} = a \times d / c \times b$$

Todos los valores RR fueron calculados según la modificación de Haldane, que evita valores indefinidos o cero para el RR cuando existe un valor cero en la tabla de 2 x 2:

$$RR = [(a + 0.5) (d + 0.5)] / [(b + 0.5) (c + 0.5)]$$

La significancia de este test se obtiene con el test de independencia por chi-cuadrado, donde a partir de la misma tabla se calcula el valor de X^2 que aproxima a una distribución chi de un grado de libertad con la que se puede calcular el p de significancia:

$$X^2 = \frac{(a \times d - b \times c)^2 \times n}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)} \quad \text{donde } n = a + b + c + d$$

Corrección por múltiples comparaciones: cuando las comparaciones son varias, como es el caso del HLA donde se comparan varios alelos, con la corrección de Bonferroni se obtiene un valor crítico corregido que es $\alpha' = \alpha / k$ donde k es el número de comparaciones que se realizan. Como el p significativo es menor que el valor crítico,

$$P < \alpha' = \alpha / k$$

$$P < \alpha / k$$

$$P \times k < \alpha$$

$$\text{Donde } P \times k = P_c \text{ (corregido)}$$

Fracción etiológica: o fracción atribuible en los expuestos es la proporción de la enfermedad en la población específica que se eliminaría si no tuvieran el marcador [131]. Esta se calcula como:

$$FE = (FAD - FAP) / (1 - FAP)$$

Donde FAD es la frecuencia antigénica del marcador en los enfermos, FAP es la frecuencia del marcador en la población control.

Estudio de la asociación de dos factores

En la asociación a enfermedad de los loci HLA, en general, se observan varios alelos asociados debido a que presentan un gran desequilibrio de ligamiento. De esta manera se hace necesario poder diferenciar cual de estos genes es el más fuertemente asociado o si actúan de forma combinada, asumiendo intuitivamente que el factor causativo es el que muestra una mayor asociación. Svejgaard y Ryder diseñaron un método simple que determina la mayor asociación [132]. Este se basa en una tabla de 4 x 2 donde se combinan los fenotipos de los dos factores asociados en controles y pacientes. A partir de estos datos se realizan 8 diferentes estudios que involucran varias tablas 2 x 2, de los que se obtiene si existe una asociación de cada factor por separado, si cada factor se asocia independientemente del otro, las diferencias entre las asociaciones de los dos factores, si hay efecto combinado y el desequilibrio de ligamiento. Este método se utilizó en los casos en que dos alelos de distintos loci se encontraron asociados a la enfermedad. La significancia estadística se estima por el método exacto de Fisher o por X^2 .

Sondas

Sondas específicas para los loci DRB

Nombre	Secuencia
1001W	TGG CAG CTT AAG TTT GAA
1002W	AG CCT AAG AGG GAG TGT C
1003	G TAC TCT ACG TCT GAG TG
1004	GAG CAG GTT AAA CAT GAG
1005W	GAG TAC TCT ACG GGT GAG
1006	TGG CAG GGT AAG TAT AAG
1007	G AAG CAG GAT AAG TTT GA
1008	GAG GAG GTT AAG TTT GAG
1009	CAG CAG GAT AAG TAT GAG
1010	GAG CTG CGT AAG TCT GAG
1011	GAG CTG CTT AAG TCT GAG
1012	GAG CAG GCT AAG TGT GAG
1013	TCT GAG TGT CAA TTC TTC
1014W	T GAG TGT TAT TTC TTC AA
1015W	T GAG TGT CAT TTC TTC AA
2801	CGG TTG CTG GAA AGA TGC
2802W	CGG TTA CTG GAG AGA CAC
2803W	CAG TTC CTG GAA AGA CTC
2804	G TAT CTG CAC AGA GGC AT
2805	G TTC CTG CAC AGA GAC AT
2806	G TTC CTG CAC AGA GGC AT
2807	G CGG TAC CTG GAC AGA TA
2808	G TTC CTG GAG AGA CAC TT
2809W	TTC CTG GAG AGA TAC TTC C
2810	G CGA GTG TGG AAC CTG AT
2811W	GAA AGA CGC GTC CAT AAC C
2813	G TTC CTG GAC AGA TAC TT
2817W	TTC CTG GAC AGA CAC TTC
3201W	AGA TAC TTC CAT AAC CAG
3202W	AGA TAC TTC TAT AAC CAA
3701	C CAA GAG GAG TCC GTG CG
3702	AAC CAG GAG GAG TCC GTG
3703	AC CAG GAG GAG AAC GTG C
3704	AT CAC CAA GAG GAG TAC G
3705W	C CAG GAG GAG CTC CTG CG

3706	C CAA GAG GAA TAC GTG CG
3707	AAC CAA GAG GAG AAC GTG
Nombre	Secuencia
3708	G CGC GTA CTC CTC TTG GT *
3709	G GAG GAC TTG CGC TTC GA
3710	CAG GAG GAG TTC CTG CGC
3711	AG GAG GAG TAC GCG CGC T
3712	CAG GAG GAG TTC GTG CGC
3713	GCG GAC GTA CTC CTC TTG *
3714	T AAC CAA GAG GAG TCC GT
3715	AT CAC CAA GAG GAG TCC G
3716W	AA CGG GAG GAG AAC CTG C
3717W	CAA GAG GAG TTC GTG CGC
4701W	G GGG GAG TAC CGG GCG GT
4702W	G GGG GAG TTC CGG GCG GT
5701	G CCT GAT GCC GAG TAC TG
5702	G CCT AGC GCC GAG TAC TG
5703	G CCT GAT GAG GAG TAC TG
5704	G CCT GCT GCG GAG CAC TG
5705	G CCT GTC GCC GAG TCC TG
5706	G CCT GAC GCT GAG TAC TG
5708	G CCT GAT GCT GAG TAC TG
5709	G CCT GTT GCC GAG TCC TG
5710W	G CCT GAT GCC CAG TAC TG
5711W	G CCT GAT GCG GAG CAC TG
5712W	G CCT GCT GCC GAG TAC TG
5713W	G CCT GTT GCC GAG TAC TG
7001	TC CTG GAG CAG AGG CGG G
7002	GAC TTC CTG GAA GAC AGG
7003	GAC CTC CTG GAA GAC AGG
7004	GGC CGG GTG GAC AAC TAC
7005	AC CGC GGC CCG CTT CTG C *
7006	G CAG AGG CGG GCC GAG GT
7007	AC ATC CTG GAA GAC GAG C
7008	AC TTC CTG GAA GAC GAG C
7009	AG CGG AGG CGG GCC GAG G
7010W	C ATC CTG GAA GAC AGG CG
7011	GAC ATC CTG GAG CAG GCG
7012	AC CGC GGC CCG CCT CTG C *
7013W	GAA GAC AGG GCC GCC GCG
7014W	GAA GAC AGG CGC GCC GCG
7015W	TG GAA GAC GAG CGG GCC G

7016W	TG GAA GAC AGG CGG GCC G
7017W	C CAG AAG GAC CTC CTG GA
7018W	C CAG AAG GAC ATC CTG GA
7019W	C CAG AAG GAC TTC CTG GA
Nombre	Secuencia
7020W	G CGG GCC GAA GTG GAC A
7021W	GGC TGC TTG CGG GGT CTG
7022W	C CTG GAG CGG AGG CGG GC
7030W	G GAA GAC AGG CGG GCC CT
7031W	CTG GAA GAC AAG CGG GCC G
7032W	G GTG GAC AAT TAC TGC AG
7033W	G CGG GGC CGG GTG GAC AA
7034W	G CGG GGC CAG GTG GAC AA
7035W	GCC GAG GTG GAC ACC TAC
7036W	GCC GAG GTG GGC ACC TAC
7037W	GAC TTC CTG GAG CAG GCG
8001W	CCC GTA ACT GTA TCT GCA *
8003W	AAC CCC GTA ATT GTA TCT *
8004W	AAC CCT GTA ATT GTA TCT *
8601	AAC TAC GGG GTT GGT GAG
8602	AAC TAC GGG GCT GTG GAG
8603	AAC TAC GGG GTT GTG GAG
8604W	C TAC GGG GTT GTT GAG AG

Sondas usadas para la tipificación genérica de DRB1

PRIMERS : 2DRBAMP-A y 2DRBAMP-B

CONDICIONES DE AMPLIFICACION: MgCl₂ 2.5 mM ; annealing 55°C

SSO		ESPECIFICIDADES DE LOCUS Y ALELOS
• DRB 1001W	DRB1*	0101+0102+0103+0104
• DRB 1003	DRB1*	03011+03012+0302+0303+0304+0305+11011+11012+1102+1103+11041 +11042+1106+1107+11081+11082+1109+1110+1111+1112+1113+1114+1115+1116+1117+1118+1119+1120+1121+1301+1302+1303+1304+1305+1306+1307+1308+1309+1310+1311+1312+1314+1315+1316+1318+1319+1320+1321+1322+1401+1402+1403+1405+1406+1407+1408+1409+1412+1413+1414+1416+1417+1418+1419+1420+1421
• DRB 1004	DRB1*	0401+0402+0403+0404+0405+0406+0407+0408+0409+0410+0411+0412+0413+0414+0415+0416+0417+0418+0419+0420+04

		21+0422+1122+1410
• DRB 1005W	DRB1*	0801+08021+08022+08031+08032+08041+08042+0805+0806+0807+0808+0809+0810+0811+1105+1201+12021+12022+12031+12032+1317+1404+1411+1415
• DRB 1006	DRB1*	0701
• DRB 1007	DRB1*	09011+09012
• DRB 1008	DRB1*	1001
• DRB 1009	DRB5*	0101+0102+0103+0201+0202+0203
• DRB 2810	DRB4*	01011+0102+0103
• DRB 3703	DRB1*	03011+03012+0302+0303+0305+1109+1301+1302+1305+1306+1309+1310+1315+1316+1318+1320+1402+1403+1406+1409+1412+1413+1417+1418+1419+1421
• DRB 3705W	DRB1*	1201+12021+12022+12031+12032
• DRB 5703	DRB1*	0415+11011+11012+1102+1103+11041+11042+1105+1106+1107+11081+11082+1109+1110+1111+1112+1113+1114+1115+1116+1117+1118+1119+1120+1121+1122+1411
• DRB 5704	DRB1*	1401+1404+1407+1410+1416+0808
• DRB 7004	DRB1*	03011+0302+0303+0304+0305+0422+1107
• DRB 7007	DRB1*	0103+0402+0414+1102+1114+1116+1120+1121+1301+1302+1304+1308+1315+1316+1317+1319+1322+1416
• DRB 7009	DRB1* DRB4*	1117+1401+1404+1405+1407+1408+1410+1411+1414+1418 01011+0102+0103
• DRB 7012	DRB1*	0101+0102+0104+0404+0405+0408+0410+0419+1402+1406+1409+1413+1417+1420
• DRB 7030W	DRB1*	1604+0412+0418+1318+1403+1412+1415+0801+08021+08022+08031+08032+08041+08042+0806+0807+0808+0809+0810+0811
• DRB 7031W	DRB1*	1303+1310

Sondas usadas para la tipificación DR1

PRIMERS : 2DRBAMP-1 y 2DRBAMP-B

CONDICIONES DE AMPLIFICACION: MgCl₂ 1.5 mM ; annealing 64°C

SSO		ESPECIFICIDADES DE LOCUS Y ALELOS
• DRB 2801	DRB1*	0101+0102+0103+0104
• DRB 3701	DRB1*	0101+0102+0103+0104

• DRB 5701	DRB1*	0101+0102+0103+0104
• DRB 7001	DRB1*	0101+0102+0104
• DRB 7007	DRB1*	0103
• DRB 7032W	DRB1*	0104
• DRB 8601	DRB1*	0101+0103
• DRB 8602	DRB1*	0102
• DRB 8603	DRB1*	0104

Sondas usadas para la tipificación de DR2 (DRB1)

PRIMERS : 2DRBAMP-2 y 2DRBAMP-B REVERSE

CONDICIONES DE AMPLIFICACION: MgCl₂ 1.5 mM ; annealing 60°C

SSO		ESPECIFICIDADES DE LOCUS Y ALELOS
• DRB 2813	DRB1*	15011+15012+15021+15022+1504+1505+1601+1602+1603+1604+1605+1606
• DRB 2817W	DRB1*	1503
• DRB 3702	DRB1*	15011+15012+15021+15022+1503+1504+1505+1601+1602+1603+1604+1605+1606
• DRB 4701W	DRB1*	1601+1602+1603+1604+1605+1606
• DRB 4702W	DRB1*	15011+15012+15021+15022+1503+1504+1505
• DRB 5701W	DRB1*	15022
• DRB 5706	DRB1*	15011+15012+15021+1503+1504+1505+1601+1602+1603+1604+1605+1606
• DRB 7002	DRB1*	1601+1603+1604
• DRB 7003	DRB1*	1602
• DRB 7010W	DRB1*	1605
• DRB 7011	DRB1*	15011+15012+15021+15022+1503
• DRB 7013W	DRB1*	1603+1606
• DRB 7014W	DRB1*	1601+1602+1605
• DRB 7018W	DRB1*	15011+15012+15021+15022+1503+1605+1606
• DRB 7019W	DRB1*	1504+1601+1603+1604
• DRB 7030	DRB1*	1604
• DRB 7037W	DRB1*	1504
• DRB 8601	DRB1*	15021+15022+1601+1602+1603+1604+1605+1606
• DRB 8603	DRB1*	15011+1503+1504+1505

Sondas usadas para la tipificación de DR4 (DRB1)

PRIMERS : 2DRBAMP-4 y 2DRBAMP-B

CONDICIONES DE AMPLIFICACION: MgCl₂ 1.5 mM ; annealing 60°C

Muestras con dos alelos del grupo DR4-DRB1, se usan los primers 2DR86AMP-GR y 2DR86AMP-VR para una asignación inequívoca de los subtipos

SSO		ESPECIFICIDADES DE LOCUS Y ALELOS
• DRB 3704	DRB1*	0401+0402+0403+0404+0405+0407+0408+0409+0410+0411+0412+0413+0414+0415+0416+0417+0418+0422
• DRB 3712 ▲	DRB1*	1410
• DRB 3715	DRB1*	0406+0419+0420+0421
• DRB 5701	DRB1*	0401+0402+0403+0404+0406+0407+0408+0413+0414+0418+0419+0420+0421+0422
• DRB 5702	DRB1*	0405+0409+0410+0411+0412+0417
• DRB 5703 ○	DRB1*	0415+1122
• DRB 5704 ▲	DRB1*	1410
• DRB 5710W	DRB1*	0416
• DRB 7001	DRB1*	0403+0404+0405+0406+0407+0408+0410+0411+0417+0419+0420
• DRB 7002 ○	DRB1*	0415+1122
• DRB 7005	DRB1*	0401+0409+0413+0416+0421
• DRB 7006	DRB1*	0403+0406+0407+0411+0417+0420
• DRB 7007	DRB1*	0402+0414
• DRB 7009 ▲	DRB1*	1410
• DRB 7010W	DRB1*	0412+0418
• DRB 7012	DRB1*	0404+0405+0408+0410+0419
• DRB 8601 ○	DRB1*	0401+0405+0407+0408+0409+0414+0416+0417+0419+0420+0421+1122
• DRB 8603 ▲	DRB1*	0402+0403+0404+0406+0410+0411+0412+0413+0415+0418+0422+1410

▲ Sondas reactivas con DRB1*1410

○ Sondas reactivas con DRB1*1122

Sondas usadas para la tipificación del grupo asociado al DR52 (DRB1)

PRIMERS : 2DRBAMP-3 y 2DRBAMP-B

CONDICIONES DE AMPLIFICACION: MgCl₂ 1.5 mM ; annealing 58°C

Se usan los primers 2DRBAMP-3 en combinación con los primers 2DR86AMP-GR y 2DR86AMP-VR para resolver muestras con los dos alelos del DR52-DRB1 y heterocigotas G-V en el codón 86 para obtener una asignación inequívoca.

SSO	Gen	ESPECIFICIDADES DE LOCUS Y ALELOS
• DRB 1003	DRB1*	03011+03012+0302+0303+0304+0305+11011+11012+1102+1103+11041 +11042+1106+1107+11081+11082+1109+1110+1111+1112+1113+1114+1115+1116+1117+1118+1119+1120+1121+1301+1302+1303+1304+1305+1306+1307+1308+1309+1310+1311+1312+1314+1315+1316+1318+1319+1320+1321+1322+1401+1402+1403+1405+1406+1407+1408+1409+1412+1413+1414+1416+1417+1418+1419+1420+1421
• DRB 1005W	DRB1*	0801+08021+08022+08031+08032+08041+08042+0805+0806+0807 +0808+0809+0810+0811+1105+1201+12021+12022+12031+12032+1317+1404+1411+1415
• DRB 1013	DRB1*	1405
• DRB 1014W	DRB1*	0801+08021+08022+08031+08032+08041+08042+0805+0806+0807 +0808+0809+0810+0811+1201+12021+12022+12031+12032+1317+1404+1411+1415
• DRB 1015W	DRB1*	03011+03012+0302+0303+0304+0305+11011+11012+1102+1103+11041 +11042+1105+1106+1107+11081+11082+1109+1110+1111+1112+1113+1114+1115+1116+1117+1118+1119+1120+1121+1301+1302+1303+1304+1305+1306+1307+1308+1309+1310+1311+1312+1314+1315+1316+1318+1319+1320+1321+1322+1401+1402+1403+1406+1407+1408+1409+1412+1413+1414+1416+1417+1418+1419+1420+1421
• DRB 2802W	DRB1*	1201+12021+12022+12031+12032
• DRB 2807	DRB1*	03011+03012+0304+0305
• DRB 2809W	DRB1*	0302+0303+1315+1319+1402+1403+1406+1412+1413+1418+1419+1420
• DRB 2813	DRB1*	11011+11012+1102+1103+11041+11042+1105+1106+1107+11081+11082+1109+1110+1111+1112+1113+1114+1115+1116+1117+1118+1119+1120+1121+1301+1302+1303+1304+1305+1306+1307+1308+1309+1310+1311+1312+1314+1316+1317+1318+1320+1321+1322+1401+1404+1405+1407+1408+1409+1411+1414+1415+1416+1417+1

		421+0801+08021+08022+08031+08032+08041+08042+0805+0806+0807+0808+0809+0810+0811
• DRB 3201W	DRB1*	03011+03012+0302+0303+0304+0305+1109+1110+1113+1116+1117+1120+1301+1302+1305+1306+1308+1309+1310+1315+1316+1318+1319+1320+1401+1402+1403+1404+1405+1406+1407+1408+1409+1411+1412+1413+1414+1415+1416+1417+1418+1419+1420+1421
• DRB 3202W	DRB1*	11011+11012+1102+1103+11041+11042+1105+1106+1107+11081+11082+1111+1112+1114+1115+1118+1119+1121+1303+1304+1307+1311+1312+1314+1317+1321+1322+0801+08021+08022+08031+08032+08041+08042+0805+0806+0807+0808+0810+0811
• DRB 3702W	DRB1*	0304
• DRB 3703	DRB1*	03011+03012+0302+0303+0305+1109+1301+1302+1305+1306+1309+1310+1315+1316+1318+1320+1402+1403+1406+1409+1412+1413+1417+1418+1419+1421
• DRB 3705W	DRB1*	1201+12021+12022+12031+12032
• DRB 3712	DRB1*	1110+1113+1117+1308+1319+1401+1404+1405+1407+1408+1411+1414+1415+1416+1420+0809
• DRB 3713	DRB1*	11011+11012+1102+1103+11041+11042+1105+1106+1107+11081+11082+1111+1114+1118+1119+1121+0801+08021+08022+08032+08041+08042+0805+0806+0807+0808+0810+0811+1303+1304+1307+1311+1312+1314+1317+1321+1322
• DRB 3717W	DRB1*	1112
• DRB 4702W	DRB1*	03011+03012+0304+0305+11011+11012+1102+1103+11041+11042+1105+1106+1107+11081+11082+1109+1110+1111+1112+1113+1114+1115+1116+1118+1119+1120+1121+1201+12021+12022+12031+12032+1301+1302+1304+1305+1306+1309+1310+1311+1314+1315+1316+1317+1318+1320+1321+1322+1417+1421
• DRB 5701	DRB1*	03011+03012+0302+0303+0304+0305+08021+08022+08041+08042+0809+1301+1302+1305+1306+1307+1308+1309+1310+1311+1314+1315+1316+1317+1318+1319+1320+1322+1402+1403+1406+1409+1412+

		1414+1415+1417+1419+1420+1421
• DRB 5702	DRB1*	0801+08031+08032+0805+0806+0810+1303+1304+1312+1321+1413
• DRB 5703	DRB1*	11011+11012+1102+1103+11041+11042+1105+1106+1107+11081+11082+1109+1110+1111+1112+1113+1114+1115+1116+1117+1118+1119+1120+1121+1411
• DRB 5704	DRB1*	0808+1401+1404+1407+1416
• DRB 5705	DRB1*	1201+12021+12022+12031+12032
• DRB 5708	DRB1*	1405+1418
• DRB 5711W	DRB1*	1408
• DRB 5712W	DRB1*	0811
• DRB 5713W	DRB1*	0807
• DRB 7001	DRB1*	1402+1406+1409+1413+1417+1420
• DRB 7002	DRB1*	0801+08021+08022+08041+08042+0805+0806+0807+0808+0809+0811+11011+11012+11041+11042+1105+1106+1109+1110+1112+1115+12021+12022+1305+1307+1311+1314+1318+1321+1415
• DRB 7003	DRB1*	11081+11082+1403+1412
• DRB 7004	DRB1*	03011+0302+0303+0304+0305+1107
• DRB 7007	DRB1*	1102+1114+1116+1120+1121+1301+1302+1304+1308+1315+1316+1317+1319+1322+1416
• DRB 7008	DRB1*	1103+1111
• DRB 7009	DRB1*	1117+1401+1404+1405+1407+1408+1411+1414+1418
• DRB 7010W	DRB1*	08031+08032+0810+1118+1119+1201+12031+12032+1306+1312
• DRB 7011	DRB1*	1309
• DRB 7012	DRB1*	1402+1406+1409+1413+1417+1420
• DRB 7014W	DRB1*	1201+12021+12022+12032
• DRB 7015W	DRB1*	1102+1103+1111+1114+1116+1120+1121+1301+1302+1304+1308+1315+1316+1317+1319+1320+1322+1416
• DRB 7016W	DRB1*	11011+11012+11041+11042+1105+1106+11081+11082+1109+1110+1112+1115+1118+1119+12031+1305+1306+1307+1311+1312+1314+1318+1321+0805
• DRB 7017W	DRB1*	03011+03012+0302+0303+0304+0305+1107+11081+11082+1113+1117+1320+1401+1402+1403+1404+1405+1406+1407+1408+1409+1411+1412+1413+1414+1417+1418+1419+1420+1421

• DRB 7018W	DRB1*	1102+1114+1116+1118+1119+1120+1121+1201+12031+12032+1301+1302+1303+1304+1306+1308+1309+1310+1312+1315+1316+1317+1319+1322+1416+08031+08032+0810
• DRB 7019W	DRB1*	11011+11012+1103+11041+11042+1105+1106+1109+1110+1111+1112+1115+12021+12022+1305+1307+1311+1314+1318+1321+1415+0801+08021+08022+08041+08042+0805+0806+0807+0808+0809+0811
• DRB 7022W	DRB1*	1113+1117+1401+1404+1405+1407+1408+1411+1414+1418
• DRB 7030W	DRB1*	0801+08021+08022+08031+08032+08041+08042+0806+0807+0808+0809+0810+0811+1318+1403+1412+1415
• DRB 7031W	DRB1*	1303+1310
• DRB 7032W	DRB1*	03012
• DRB 8601	DRB1*	0302+0305+0801+08021+08022+08031+08032+0805+0807+0808+0809+0811+11011+11012+1105+11081+11082+1109+1110+1111+1112+1114+1115+1119+1120+1302+1303+1305+1307+1312+1314+1321+1402+1403+1407+1409+1413+1414+1419
• DRB 8602	DRB1*	1106+1121+1201+12021+12022
• DRB 8603	DRB1*	03011+03012+0303+0304+08041+0806+0810+1102+1103+11041+11042+1107+1113+1116+1117+1118+12031+12032+1301+1304+1306+1308+1309+1310+1311+1315+1317+1318+1319+1320+1322+1401+1404+1405+1406+1408+1411+1412+1415+1416+1417+1418+1420+1421
• DRB 8604W	DRB1*	08042

Sondas usadas para la tipificación del DRB3

PRIMERS : 2DRBAMP-52 y 2DRBAMP-B

CONDICIONES DE AMPLIFICACION: MgCl₂ 1.5 mM ; annealing 66°C

SSO	Gen	ESPECIFICIDADES DE LOCUS Y ALELOS
• DRB 2807	DRB3*	0101
• DRB 2808	DRB3*	0201+0202+0203
• DRB 2809	DRB3*	0301
• DRB 3702	DRB3*	0203
• DRB 8601	DRB3*	0101+0202+0203
• DRB 8603	DRB3*	0201+0301

Sondas específicas para el locus DQA1

Nombre	Secuencia
2501	T GGC CAG TAC ACC CAT GA
2502	T GGC CAG TTC ACC CAT GA
2503	T GGG CAG TAC AGC CAT GA
3401	GA GAT GAG GAG TTC TAC G
3402	GA GAT GAG CAG TTC TAC G
3403	GA GAC GAG CAG TTC TAC G
4101W	AC CTG GAG AGG AAG GAG A
4102	AC CTG GAG AAG AAG GAG A
4103W	AC CTG GGG AGG AAG GAG A
Nombre	Secuencia
5501	TC AGC AAA TTT GGA GGT T
5502W	TC CAC AGA CTT AGA TTT G
5503	TC CGC AGA TTT AGA AGA T
5504	TC AGA CAA TTT AGA TTT G
5901W	TTT GAC CCG CAA TTT GCA
5902W	TTT GAC CGG CAA TTT GCA
6901	ATG GCT GTG GCA AAA CAC
6902	ATC GCT GTG CTA AAA CAT
6903	ATC GCT GTC CTA AAA CAT
6904	ATC GCT GTG ACA AAA CAC
7502	C TTG AAC ATC CTG ATT AA
7504W	C TTG AAC AGT CTG ATT AA

Sondas usadas para la tipificación de DQA1

PRIMERS : 2DQAAMP-A y 2DQAAMP-B

CONDICIONES DE AMPLIFICACION: MgCl₂ 2.0 mM ; annealing 55°C

SSO		ESPECIFICIDADES DE LOCUS Y ALELOS
• DQA 2501	DQA1*	0101+01021+01022+0104+0401+05011+05012+05013+0502+0503
• DQA 2502	DQA1*	0103+0201+0601
• DQA 2503	DQA1*	03011+0302
• DQA 3401	DQA1*	0101+0104
• DQA 3402	DQA1*	01021+01022+0103+05011+05012+05013+0502+0503
• DQA 3403	DQA1*	0401+0601
• DQA 4101W	DQA1*	0101+01021+01022+0104+0201+03011+0302
• DQA 4102	DQA1*	0103
• DQA 4103W	DQA1*	0401+05011+05012+05013+0502+0503+0601
• DQA 5501	DQA1*	0101+01021+01022+0103+0104
• DQA 5502	DQA1*	0201
• DQA 5503	DQA1*	03011+0302
• DQA 5504	DQA1*	0401+0601+05011+05012+05013+0502+0503
• DQA 5901W	DQA1*	0201+03011+0302+0401+05011+05012+05013+0503+0601
• DQA 5902W	DQA1*	0502
• DQA 6901	DQA1*	0101+01021+01022+0103+0104
• DQA 6902	DQA1*	0201+03011+0302
• DQA 6903	DQA1*	05011+05012+05013+0502+0503
• DQA 6904	DQA1*	0401+0601
• DQA 7502	DQA1*	0201+0401+0601
• DQA 7504W	DQA1*	05011+05012+05013+0502+0503

Sondas específicas para el locus DQB1

Nombre	Secuencia
2301	G ACC GAG CTC GTG CGG GG
2302	AAC GGG ACC GAG CGC GTG
2601	CGG GGT GTG ACC AGA CAC
2602	CGT TAT GTG ACC AGA TAC
2603	CGT CTT GTG ACC AGA TAC
2604	CGT CTT GTA ACC AGA CAC
2605W	CGT CTT GTG AGC AGA AGC
2606	CGT CTT GTA ACC AGA TAC
2607W	G GGT GTG ACC AGA TAC AT

3701	AG GAG TAC GTG CGC TTC G
3702	AG GAG GAC GTG CGC TTC G
3703W	T AAC CGA GAA GAG TAC GT
3704W	G GAG TAC GCG CGC TTC GA
3705W	G GAG TAC GCA CGC TTC GA
4501	GAC GTG GAG GTG TAC CGG
4901	G GTG TAC CGG GCA GTG AC
4902W	G GTG TAT CGG GCG GTG AC
5701	G CGG CCT GTT GCC GAG TA
5702	G CGG CCT AGC GCC GAG TA
5703	G CGG CCT GAC GCC GAG TA
5704	G CGG CCT GAT GCC GAG TA
5705	GG CTG CCT GCC GCC GAG T
5706	GG CCG CCT GAC GCC GAG T
5707W	TG GGG CCG CCT GCC GCC G
5708	G CGG CTT GAC GCC GAG TA
5709W	G CGG CCT GTC GCC GAG TA
7001W	TG GAG GGG GCC CGG GCG T
7002	G ACC CGA GCG GAG TTG GA
Nombre	Secuencia
7003	GAG GGG ACC CGG GCG GAG
7004W	CTG GAG AGG ACC CGG GCG
7005	G AAA CGG GCG GCG GTG GA
7006W	CTG GAG GAG GAC CGG GCG
7007W	AGG ACC CGG GCG GCG GTG
7008W	ACC CGG GCG GAG TTG GAC
7009W	G GTG GAC AGG GTG TGC AG
7010W	G GTG GAC ACC GTA TGC AG

Sondas usadas para la tipificación de DQB1

PRIMERS : 2DQBAMP-A y 2DQBAMP-B

CONDICIONES DE AMPLIFICACION: MgCl₂ 2.0 mM; annealing 55°C

SSO		ESPECIFICIDADES DE LOCUS Y ALELOS
• DQB 2301	DQB1*	0401
• DQB 2302	DQB1*	0402+0305

• DQB 2601	DQB1*	0501+0502+05031+05032
• DQB 2602	DQB1*	0301+0304+06011+06012
• DQB 2603	DQB1*	0302+03032+0602
• DQB 2604	DQB1*	0603+0604+0607+0608
• DQB 2605W	DQB1*	0201+0202
• DQB 2606	DQB1*	06051+06052+0606+0609
• DQB 2607	DQB1*	0305+0401+0402+0504
• DQB 3701	DQB1*	0501+0502+05031+05032
• DQB 3702	DQB1*	06011+06012
• DQB 3703W	DQB1*	0504
• DQB 3704W	DQB1*	0602+0603+0604+06051+06052+0606+0607+0608+0609+0305+0401+0402
• DQB 3705W	DQB1*	0301+0302+03032+0304
• DQB 4501	DQB1*	0301+0304
• DQB 4901	DQB1*	0501
• DQB 4902W	DQB1*	05031+05032+06011+06012+0302+03032+0305+0401+0402
• DQB 5701	DQB1*	0501+0604+06051+0606+0608+0609

• DQB 5702	DQB1*	0502+0504
• DQB 5703	DQB1*	05031+06011+06012
• DQB 5704	DQB1*	05032+0602+0603+0607
• DQB 5705	DQB1*	0201+0202
• DQB 5706	DQB1*	0301+03032
• DQB 5707	DQB1*	0302+0304+0305
• DQB 5708	DQB1*	0401+0402
• DQB 5709W	DQB1*	06052
• DQB 7001W	DQB1*	0501+0502+05031+05032
• DQB 7002	DQB1*	06011+06012
• DQB 7003	DQB1*	0602+0603+0608
• DQB 7004W	DQB1*	0301+0302+03032+0304+0305+0604+06051+06052+0606+0607+0609

• DQB 7005	DQB1*	0201+0202
• DQB 7006W	DQB1*	0401+0402+0504
• DQB 7007W	DQB1*	0606
• DQB 7008W	DQB1*	0301+0302+03032+0304+0305+0602+0603+0604+06051+06052+0607+0608+0609
• DQB 7009W	DQB1*	0501+0504+0606
• DQB 7010W	DQB1*	0401+0402

RESULTADOS

Distribución de las frecuencias alélicas de los loci DRB1, DQA1, DQB1 y DRB3 en una población normal de Buenos Aires

Frecuencias de los antígenos DR

La primera tipificación realizada es la que determina las especificidades serológicas del antígeno DR: DR genérico. En la tabla 6 se muestra la distribución de frecuencias (alélicas y antigénicas) de esta primera etapa. En nuestra población, se han encontrado trece antígenos DR (DR1-DR16). Los DR más frecuentes son el 7, 13, 4, 11, 3 y 15, cuyas frecuencias fenotípicas son de 25,5 %, 23,1 %, 22,6 %, 22,1 %, 20,7 % y 19,3 % respectivamente. Estos antígenos son los predominantes en otras poblaciones de origen caucásico. El resto de los antígenos excepto el DR 1 (15,4 %) no superan el 10 %. Los antígenos menos frecuentes son los DR 9, 10 y 12, que son dominantes en poblaciones orientales. En la figura 8 se comparan las frecuencias fenotípicas de dos poblaciones caucásicas y una oriental con la nuestra.

DR	Alelos		Antígenos	
	N	%	N	%
01*	34	8,17%	32	15,38%
03*	45	10,82%	43	20,67%
04*	52	12,50%	47	22,60%
07*	57	13,70%	53	25,48%
08*	31	7,45%	29	13,94%
09*	8	1,92%	8	3,85%
10*	5	1,20%	5	2,40%
11*	48	11,54%	46	22,12%
12*	4	0,96%	4	1,92%
13*	53	12,74%	48	23,08%
14*	19	4,57%	19	9,13%
15*	40	9,62%	40	19,23%
16*	20	4,81%	20	9,62%

Tabla 6.

Frecuencias alélicas y antigénicas de la tipificación genérica de DR en la población normal.

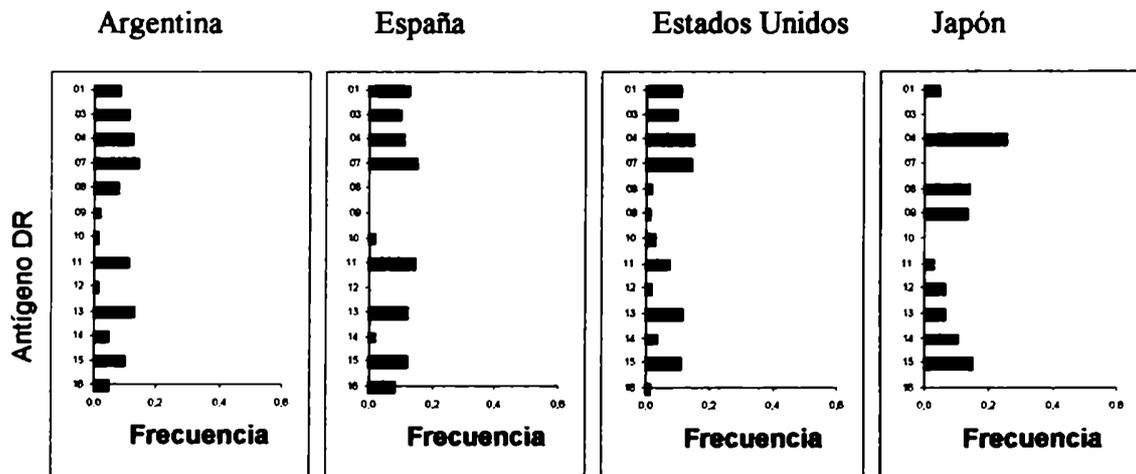


Figura 8.

Histograma de frecuencias de DR en tres poblaciones caucásicas y una oriental. Las frecuencias de Argentina están representadas por la muestra de panel normal de Buenos Aires.

Nuestra población presenta similitudes con las poblaciones de España y Estados Unidos pero se diferencia de la de Japón. El DR 4 es el antígeno más frecuente en japoneses, el que difiere significativamente con las otras tres poblaciones ($p < 0,05$). Otra diferencia importante es la del DR 9 y el DR 12, antígenos comunes en poblaciones orientales pero no en caucásicas. Estas diferencias se hacen más evidentes en los estudios de subtipos de estos genes, como observaremos más adelante. Estos resultados muestran además, una mayor diversidad de antígenos en nuestra población y en la de Estados Unidos, probablemente como consecuencia de mezcla étnica.

Frecuencias de los alelos del locus DRB1

La tipificación de los subtipos de cada linaje también muestra una gran variación. De los cuatro alelos DR 1 descritos, 3 fueron hallados en nuestro panel normal. Al igual que se observa en otras poblaciones caucásicas el alelo DRB1*0101 es el más

frecuente (tabla 7a). Los alelos encontrados del linaje del DR 2 (DR 15 y DR 16) son seis, lo que muestra una gran heterogeneidad. Además de los alelos típicamente caucásicos, DRB1*1501 y 1601, hallamos el alelo DRB1*1502 frecuente en orientales (especialmente en Tailandia). Por otro lado, se encontró un alelo amerindio el DRB1*1602 y otro poco común, el DRB1*1605, aunque en españoles se encuentra con baja frecuencia.

El linaje del DR 4 es bastante heterogéneo, habiéndose encontrado 11 alelos. El DRB1*0401, el más frecuente, se lo encuentra también en poblaciones españolas e italianas en similar proporción. El alelo DRB1*0404 es un alelo común en indios brasileños y el DRB1*0405 es muy frecuente en poblaciones orientales aunque también se lo encuentra con baja frecuencia en caucásicos españoles. Los DRB1*0407 y el DRB1*0411 son alelos que fueron descritos en tribus de amerindios, principalmente en guaraníes.

Dentro del grupo asociado al DRB3, el DR 3, que posee 5 alelos, sólo se representa con el DRB1*0301, alelo comúnmente encontrado en poblaciones caucásicas. El DR 11 tiene 7 alelos, de los que el DRB1*1101 y el *1104 son los más frecuentes. Se encontró un alelo muy raro, el DRB1*1115, que fue secuenciado para confirmar el patrón por oligotipificación. En los DR 13 el DRB1*1301 y 1302 son los más frecuentes y en los DR 14 el DRB1*1401 y *1402.

De los linajes que exhiben un sólo alelo, como el DR 7, DR 9 y DR10, el DRB1*0701 es el que tiene la mayor frecuencia de este locus: 13,7 %. Contrariamente, los alelos DRB1*0901 y 1001 se muestran con una frecuencia muy baja. El grupo del DR 8 tiene, como más frecuente, un alelo típicamente amerindio, el DRB1*0802. Este linaje es bastante heterogéneo, con 7 alelos.

a. Linaje del DR1

ALELO DRB1*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0101	23	5,53%	23	11,06%
0102	6	1,44%	6	2,88%
0103	5	1,20%	5	2,40%

b. Linaje del DR2

ALELO DRB1*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
1501	29	6,97%	29	13,94%
1502	7	1,68%	7	3,37%
1503	4	0,96%	4	1,92%
1601	15	3,61%	15	7,21%
1602	3	0,72%	3	1,44%
1605	1	0,24%	1	0,48%

c. Linaje del DR4

ALELO DRB1*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0401	12	2,88%	12	5,77%
0402	7	1,68%	7	3,37%
0403	6	1,44%	6	2,88%
0404	7	1,68%	7	3,37%
0405	2	0,48%	2	0,96%
0407	8	1,92%	8	3,85%
0408	4	0,96%	4	1,92%
0409	2	0,48%	2	0,96%
0410	1	0,24%	1	0,48%
0411	2	0,48%	2	0,96%
0413	1	0,24%	1	0,48%

d. Linajes asociados al locus DRB3

ALELO DRB1*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0301	45	10,82%	43	20,67%
1101	26	6,25%	25	12,02%
1102	3	0,72%	3	1,44%
1103	4	0,96%	4	1,92%
1104	12	2,88%	12	5,77%
1106	1	0,24%	1	0,48%
1108	1	0,24%	1	0,48%
1115	1	0,24%	1	0,48%
1201	4	0,96%	4	1,92%
1301	23	5,53%	22	10,58%
1302	23	5,53%	23	11,06%
1303	4	0,96%	4	1,92%
1305	2	0,48%	2	0,96%
1307	1	0,24%	1	0,48%
1401	9	2,16%	9	4,33%
1402	7	1,68%	7	3,37%
1404	1	0,24%	1	0,48%
1406	2	0,48%	2	0,96%

e. Linajes de alelos únicos

ALELO DRB1*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0701	57	13,70%	53	25,48%
0901	8	1,92%	8	3,85%
1001	5	1,20%	5	2,40%

f. Linaje del DR8

ALELO DRB1*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0801	7	1,68%	7	3,37%
0802	11	2,64%	11	5,29%
0803	2	0,48%	2	0,96%
0804	4	0,96%	4	1,92%
0806	1	0,24%	1	0,48%
0807	5	1,20%	5	2,40%
0808	1	0,24%	1	0,48%

Tabla 7.

Frecuencias alélicas y antigénicas de los alelos de los diferentes linajes del gen DRB1.

Frecuencias de los alelos de los loci DQA1, DQB1 y DRB3

El locus DQA1 se encuentra a aproximadamente 80 kb hacia el centrómero del locus DRB1. Esta cercanía hace que la frecuencia de recombinación sea muy baja y por lo tanto exista un gran ligamiento entre estos dos genes. Además, el desequilibrio de ligamiento que tienen estos dos genes es muy alto. El locus DQA1 posee menor polimorfismo que el DRB1, existiendo 14 alelos descritos, de los cuales sólo se puede tipificar 8 y 7 se encontraron en este panel. Los alelos más frecuentes son los DQA1*05 y DQA1*03 con frecuencias 26,92% y 16,83% respectivamente (tabla 8).

A unas 50 kb del locus DQA1 se encuentra el locus DQB1, el cual exhibe un mayor polimorfismo que el primero, con 26 alelos, 20 de los cuales pueden ser tipificados. Doce alelos se presentan en nuestra población, de los cuales el DQB1*0201 y *0301 son los más frecuentes (tabla 9). El DQB1*0201 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el DQA1*0201 y *05 formando haplotipos muy frecuentes. El DQB1*0301 se encuentra con el DQA1*05 y el DQA1*03.

El gen DRB3 se halla a 70 kb del DRB1 hacia el telómero. Este no se presenta en todos los individuos, sino únicamente en algunos haplotipos, específicamente los que tienen alelos de los grupos DR 3, 11, 12, 13 y 14. El polimorfismo de éste es muy bajo con sólo 7 alelos, de los que podemos reconocer 5, siendo los más frecuentes, el DRB3*0101 y el *0202 (tabla 10).

ALELO DQA1*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0101	53	12,74%	50	24,04%
0102	67	16,11%	64	30,77%
0103	30	7,21%	29	13,94%
0201	57	13,70%	53	25,48%
03	70	16,83%	61	29,33%
0401	21	5,05%	21	10,10%
05	112	26,92%	100	48,08%

Tabla 8.
Frecuencias alélicas y antigénicas del locus DQA1

ALELO DQB1*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0201	88	21,15%	80	38,46%
0301	85	20,43%	80	38,46%
0302	39	9,38%	39	18,75%
0303	24	5,77%	24	11,54%
0402	24	5,77%	24	11,54%
0501	42	10,10%	39	18,75%
0502	15	3,61%	15	7,21%
0503	10	2,40%	10	4,81%
0601	5	1,20%	5	2,40%
0602	36	8,65%	36	17,31%
0603	24	5,77%	23	11,06%
0604	19	4,57%	19	9,13%

Tabla 9.
Frecuencias alélicas y antigénicas del locus DQB1

ALELO DRB3*	Alelos		Antígenos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0101	55	35,95%	49	40,83%
0201	2	1,31%	2	1,67%
0202	80	52,29%	69	57,50%
0301	16	10,46%	16	13,33%

Tabla 10.
Frecuencias alélicas y antigénicas del locus DRB3 (N= 120)

Seguidamente se estudió si cada uno de estos loci mencionados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. El p exacto del test nos indica si existen diferencias significativas con respecto a la hipótesis que los genotipos observados son producidos por la unión al azar de gametas. Los resultados de este análisis son los siguientes:

locus DRB1, $p = 0.94$; locus DQA1, $p = 0.65$; locus DQB1, $p = 0.25$. Estos resultados fueron obtenidos con una cadena de Markov de 100000 pasos lo que garantiza la exactitud del test. Los resultados muestran que los tres loci ajustan a las frecuencias esperadas en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Haplotipos de los loci DRB1-DQA1-DQB1

Las frecuencias haplotípicas (combinación de alelos de diferentes loci en el mismo cromosoma) se estimaron por el algoritmo de EM (*expectation-maximization*) [122, 123]. Los haplotipos mostrados son los que tienen una frecuencia mayor a 0,4 %. Teniendo en cuenta que se encontraron 48 alelos del locus DRB1, 7 alelos del locus DQA1 y 12 alelos del DQB1, combinados al azar, podríamos llegar a tener 4032 haplotipos diferentes. De los 406 haplotipos estudiados (203 individuos), los 38 que se muestran abarcan el 86 % del total, lo cual demuestra el alto desequilibrio de ligamiento que poseen estos 3 loci. Además, en general, se puede observar que cada linaje alélico de DR exhibe un haplotipo en común. De esta manera, los DR 1 se asocian siempre con el haplotipo DQA1*0101-DQB1*0501 o los DR 11 con el haplotipo DQA1*05-DQB1*0301 (tabla 11). En otros casos se ven asociaciones con no más de 3 haplotipos DQ. Este es el caso del DR 15, el que presenta asociaciones con 3 haplotipos diferentes: DQA1*0101-DQB1*0602, DQA1*0102-DQB1*0602 y DQA1*0103-DQB1*0601. Los haplotipos más frecuentes son el número 4, DRB1*0301-DQA1*05-DQB1*0201 y el número 14, DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201, ambos con una frecuencia del 10,6 %. El desequilibrio de ligamiento se analizó de a pares de loci, en los que se obtuvo D, D' y el p respectivo. Se puede observar en las tablas 12 y 13 la existencia de varias combinaciones de alelos con un desequilibrio de ligamiento absoluto ($D' = 1$). También se encuentran alelos que

pueden estar combinados con otros dos. Este es el caso del DRB1*0802 que puede estar tanto con el DQA1*03 ó DQA1*0401 y con el DQB1*0302 o DQB1*0402. Es interesante notar que en este caso no existen combinaciones como DRB1*0802 con DQA1*03-DQB1*0402 o con DQA1*0401-DQB1*0302, lo cual está causado por el fuerte desequilibrio de ligamiento que existe entre estos alelos en DQA1-DQB1.

Haplotipo	DRB1	DQA1	DQB1	Frecuencia
1	0101	0101	0501	5,42%
2	0102	0101	0501	0,74%
3	0103	0101	0501	1,23%
4	0301	05	0201	10,59%
5	0301	05	0301	0,49%
6	0401	03	0301	1,48%
7	0401	03	0302	0,49%
8	0402	03	0302	1,48%
9	0403	03	0302	0,99%
10	0404	03	0302	1,23%
11	0405	03	0302	0,49%
12	0407	03	0302	1,23%
13	0408	03	0301	0,49%
14	0701	0201	0201	10,59%
15	0701	0201	0303	2,96%
16	0801	0401	0402	1,72%
17	0802	03	0302	1,23%
18	0802	0401	0402	1,23%
19	0804	0401	0402	0,49%
20	0807	0401	0402	1,23%
21	0901	03	0303	1,97%
22	1001	0101	0501	1,23%

Haplotipo	DRB1	DQA1	DQB1	Frecuencia
23	1101	05	0301	5,91%
24	1103	05	0301	0,99%
25	1104	05	0301	2,22%
26	1201	05	0301	0,99%
27	1301	0103	0603	5,17%
28	1302	0102	0501	0,49%
29	1302	0102	0604	4,43%
30	1303	05	0301	0,99%
31	1401	0101	0503	1,97%
32	1402	05	0301	1,72%
33	1406	05	0301	0,49%
34	1501	0101	0602	0,49%
35	1501	0102	0602	6,40%
36	1502	0103	0601	0,99%
37	1503	0102	0602	0,99%
38	1601	0102	0502	2,71%
Total				85,96%

Tabla 11.

Frecuencias de haplotipos para los loci DRB1, DQA1 y DQB1.

Haplotipo DRB1-DQA1	N	D	D'	p
0101-0101	23	0.05	1.00	0.00
0301-05	45	0.08	1.00	0.00
0401-03	10	0.02	1.00	0.00
0402-03	6	0.01	1.00	0.00
0403-03	6	0.01	1.00	0.00
0404-03	6	0.01	1.00	0.00
0407-03	7	0.01	1.00	0.00
0701-0201	57	0.12	1.00	0.00
0801-0401	7	0.02	1.00	0.00
0802-03	5	0.01	0.4	0.00
0802-0401	5	0.01	0.47	0.00
0901-03	8	0.02	1.00	0.00
1001-0101	5	0.01	1.00	0.00
1101-05	24	0.04	0.94	0.00
1104-05	10	0.02	0.77	0.00
1301-0103	22	0.05	0.95	0.00
1302-0102	20	0.04	0.89	0.00
1401-0101	8	0.02	0.87	0.00
1402-05	7	0.01	1.00	0.00
1501-0102	26	0.05	0.88	0.00
1502-0103	5	0.01	0.69	0.00
1601-0102	12	0.02	0.83	0.00

Tabla 12.

Desequilibrio de ligamiento entre alelos de los genes DRB1 y DQA1.

Haplotipo DRB1-DQB1	N	D	D'	p
0101-0501	22	0.05	1.00	0.00
0301-0201	43	0.08	0.94	0.00
0401-0301	6	0.01	0.50	0.00
0402-0302	6	0.01	1.00	0.00
0403-0302	4	0.01	0.63	0.00
0407-0302	5	0.01	0.69	0.00
0701-0303	12	0.02	0.42	0.00
0701-0201	43	0.08	0.70	0.00
0801-0402	7	0.02	1.00	0.00
0802-0302	5	0.01	0.45	0.00
0802-0402	5	0.01	0.47	0.00
0901-0303	8	0.02	1.00	0.00
1101-0301	25	0.05	1.00	0.00
1104-0301	9	0.02	0.88	0.00
1301-0603	21	0.05	0.91	0.00
1302-0604	19	0.05	1.00	0.00
1401-0503	8	0.02	0.89	0.00
1402-0301	7	0.01	1.00	0.00
1501-0602	28	0.06	0.96	0.00
1601-0502	12	0.03	0.92	0.00

Tabla 13.

Desequilibrio de ligamiento de alelos de los loci DRB1 y DQB1

Distribución de las frecuencias alélicas de los loci DRB1, DQA1 y DOB1 en dos poblaciones indígenas del noroeste de Argentina

Frecuencias de los antígenos DR

En la tabla 14 se comparan las especificidades DR de las dos muestras de indios estudiados (chiriguano y wichí) con las de nuestro panel normal. A primera vista se puede observar que la diversidad de antígenos es menor en las muestras indígenas que en la del panel normal. Los antígenos DR 3, 10 y 11 están ausentes en la muestra de chiriguano, mientras que los DR 1, 10, 12, 13, 15 y 16 faltan en los wichí. De todas formas esta falta de diversidad puede deberse al bajo número de individuos analizado. Por otro lado se observan ciertos antígenos predominantes y el resto posee una muy baja frecuencia. En los chiriguano los antígenos DR14, 16, 4 y 8 se presentan en frecuencias mayores del 20 %, mientras que los demás se encuentran por debajo del 10 % (tabla 14). La frecuencia del DR 14 aparece aumentada tanto en chiriguano como en los wichí. Este antígeno se lo encontró aumentado en varias poblaciones de indios americanos. El DR 4 es el antígeno de mayor frecuencia en los wichí, presentándose en el 63 % de los individuos. Los antígenos DR 8 y DR 9 aparecen con frecuencias del 26 % y 10 % respectivamente. En cambio, en chiriguano, sólo el DR 8 tiene una frecuencia similar. Respecto al panel normal, se observan principalmente diferencias con el DR 14, el cual está entre 6 y 7 veces aumentado en las dos poblaciones de indios, mientras que el DR 4 aumenta su frecuencia casi 3 veces en wichí. El DR 12, que está con mayor frecuencia en chiriguano, es un antígeno que se lo encuentra predominantemente en poblaciones orientales.

Especificidades DR	Panel normal N = 208	Wichis N = 19	Chiriguanos N = 56
01*	15,38%	0,00 %	1,79 %
03*	20,67%	5,26 %	0,00 %
04*	22,60%	63,16 %	25,00 %
07*	25,48%	5,26 %	3,57 %
08*	13,94%	26,32 %	26,79 %
09*	3,85%	10,53 %	3,57 %
10*	2,40%	0,00 %	0,00 %
11*	22,12%	5,26 %	0,00 %
12*	1,92%	0,00 %	8,93 %
13*	23,08%	0,00 %	1,79 %
14*	9,13%	57,89 %	66,07 %
15*	19,23%	0,00 %	5,36%
16*	9,62%	0,00 %	33,93%

Tabla 14.

Distribución de frecuencias de los antígenos DR en las muestras de indios wichis y chiriguanos, las que se comparan con las del panel normal.

Subtipos alélicos del locus DRB1

En las muestras indígenas se observa un menor polimorfismo en el DRB1, probablemente en parte debido al bajo número de individuos muestreados. El número de alelos encontrados en los wichis fue de 12, este número es menor que el que se obtiene tomando muestras al azar de 19 individuos de nuestro panel normal, las que presentan en promedio 19 ± 2 alelos. Los chiriguanos tienen 19 alelos que comparados con los obtenidos de muestras al azar también es menor (32 ± 3 alelos). Esto demuestra que la diversidad alélica en estas poblaciones es menor que la de nuestro

panel normal. Esto mismo se puede encontrar en el análisis de los linajes de DR. En el linaje del DR 1, únicamente los chiriguanos presentan un alelo y en un sólo individuo, el DRB1*0101 (tabla 15). Al igual que el DR 1, el linaje del DR 2, aparece reducido en los chiriguanos, donde un alelo, el DRB1*1602, con una frecuencia alta, casi del 18 %. Este alelo es uno de los dominantes en poblaciones indígenas americanas. El DR4, otro de los antígenos frecuentes en poblaciones de amerindios, muestra su mayor frecuencia en el alelo DRB1*0411 (wichis 21 % y chiriguanos 5 %), el alelo DRB1*0404, en wichis llega al 10 %. Estos alelos típicamente amerindios, en el panel normal poseen baja frecuencia (DRB1*0404 con 3,4 % y DRB1*0411 con 1 %). El grupo asociado al DRB3, presenta muy pocos alelos (menos de 5) comparado con los 18 del panel normal. Los alelos que dominan este grupo son los DRB1*1402 y el DRB1*1406.

a. Linaje del DR1

ALELO	Wichis		Chiriguanos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0101	0	0%	1	0,89%

b. Linaje del DR2

ALELO	Wichis		Chiriguanos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
1501	0	0%	1	0,89%
1502	0	0%	2	1,79%
1602	0	0%	20	17,86%
1604	0	0%	1	0,89%

c. Linaje del DR4

ALELO	Wichis		Chiriguano	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0401	0	0%	1	0,89%
0403	0	0%	2	1,79%
0404	4	10,53%	1	0,89%
0407	0	0%	6	5,36%
0411	8	21,05%	5	4,46%
0417	3	7,89%	0	0%

d. Linaje asociado al DRB3

ALELO	Wichis		Chiriguano	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0301	1	2,63%	0	0%
1101	1	2,63%	0	0%
1201	0	0%	5	4,46%
1302	0	0%	1	0,89%
1402	6	15,79%	24	21,43%
1406	4	10,53%	22	19,64%
1409	1	2,63%	0	0%

e. Linaje de alelos únicos

ALELO	Wichis		Chiriguano	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0701	1	2,63%	2	1,79%
0901	2	5,26%	2	1,79%

f. Linaje del DR8

ALELO	Wichis		Chiriguanos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0802	4	10,53%	12	10,71%
0804	1	2,63%	3	2,68%
0807	0	0%	1	0,89%

Tabla 15.

Frecuencias alélicas del locus DRB1 en la población Wichi y chiriguanos.

Frecuencias alélicas de los loci DQA1 y DQB1

Los loci DQA1 y DQB1 son mucho menos polimórficos que el DRB1. De los 7alelos encontrados en el panel normal en el locus DQA1 sólo 4 alelos se hallan en wichis y 6 en chiriguanos. Los alelos más frecuentes son los DQA1*03 y el DQA1*05, el primero es más frecuente en wichis en tanto que el segundo es más frecuente en chiriguanos (tabla 16). El hecho de que el alelo DQA1*05 este con una frecuencia del 60 % en chiriguanos, se corresponde con la frecuencia de los alelos del locus DRB1 que forman el haplotipo con este, el DRB1*1402, el DRB1*1406 y el DRB1*1602 que son los 3 alelos más frecuentes del locus. El DQB1 presenta en wichis dos alelos predominantes: DQB1*0301 con una frecuencia de 42 % (generalmente asociado al DQA1*05) y DQB1*0302 con una frecuencia del 39 % (acompañado generalmente del DQA1*03). En chiriguanos, el alelo más frecuente es el que se asocia al DQA1*05, el DQB1*0301, el cual presenta una frecuencia de 59 % (tabla 17).

ALELO	Wichis		Chiriguanos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0101	0	0%	5	4,46%
0102	0	0%	3	2,68%
0201	1	2,63%	2	1,79%
03	17	44,74%	17	17,86%
0401	5	13,16%	15	13,39%
05	15	39,47%	67	59,82%

Tabla 16.

Frecuencias alélicas del locus DQA1 en wichis y chiriguanos.

ALELO	Wichis		Chiriguanos	
	N	Frecuencias	N	Frecuencias
0201	1	2,63%	2	1,79%
0301	16	42,11%	66	58,93%
0302	15	39,47%	15	13,39%
0303	1	2,63%	2	1,79%
0402	5	13,16%	16	14,29%
0501	0	0%	2	4,46%
0602	0	0%	1	1,79%
0604	0	0%	1	0,89%

Tabla 17.

Frecuencias alélicas del locus DQB1 en wichis y chiriguanos.

Haplotipos más frecuentes de los loci DRB1-DQA1-DQB1

El haplotipo DQA1*03-DQB1*0302 que está presente en la mayoría de los alelos del DR 4 (tabla 18 y 19) es propio del linaje, como puede verse en el panel normal (tabla 11). El haplotipo DRB1*04-DQA1*05-DQB1*0302 no es un haplotipo común para los DR 4 (tabla 18), incluso no está descrito un haplotipo DQA1*05-DQB1*0302 para ningún otro DRB1. Uno de los dos individuos en que se encontró fue tipificado como DRB1*0417/0411, DQA1*03/05, DQB1*0302/x, lo que muestra que el DQA1*05 estaría asociado a cualquiera de los dos DR 4. En los chiriguanos se encuentran un haplotipos poco común en poblaciones amerindias, el DRB1*1201-DQA1*0101-DQB1*0501(tabla 19). Este haplotipo, presente en poblaciones negras africanas [117], indicaría la existencia de cierto grado de mezcla en la población Chiriguano.

Haplotipo	DRB1	DQA1	DQB1	Frecuencias
1	0404	03	0302	5,26%
2	0411	03	0302	15,79%
3	0411	05	0302	5,26%
4	0417	03	0302	7,89%
5	0802	0401	0402	10,53%
6	1402	05	0301	10,53%
7	1406	05	0301	7,89%

Tabla 18.

Principales haplotipos DRB1-DQA1-DQB1 en indios wichis.

Haplotipo	DRB1	DQA1	DQB1	Frecuencias
1	0403	03	0302	1,79%
2	0407	03	0302	4,46%
3	0411	03	0302	3,57%
4	0701	0201	0201	1,79%
5	0802	0401	0402	8,93%
6	0804	0401	0402	2,68%
7	1201	0101	0501	1,79%
8	1201	05	0301	2,68%
9	1402	05	0301	16,96%
10	1402	05	0302	1,79%
11	1406	05	0301	17,86%
12	1502	05	0301	1,79%
13	1602	05	0301	13,39%
14	1602	0101	0501	1,79%

Tabla 19.

Frecuencias de los principales haplotipos DRB1-DQA1-DQB1 hallados en indios chiriguanos.

Análisis filogenético

Para este análisis se incluyeron 24 poblaciones de diferentes grupos étnicos y regiones geográficas, las que fueron tipificadas para los loci DRB1, DQA1 y DQB1. En la tabla 20, se adjunta cada población con la región donde habita y la referencia de la publicación correspondiente.

Población	Región	Grupo y subgrupo Lingüístico	Referencia
Buenos Aires (BsAs)			
Wichi (Wi)	Orán, Salta	Geno-Pano-Caribe, Macro-Panoan	
Chiriguano (Chi)	Orán, Salta	Ecuatorial-Tucanoan, Ecuatorial	
Wichi (Wi-2)	Chaco	Geno-Pano-Caribe, Macro-Panoan	[133]
Tobas del Este (Toba-E)	Chaco	Geno-Pano-Caribe, Macro-Panoan	[133]
Tobas-Pilagás (Tobas-Pil)	Chaco	Geno-Pano-Caribe, Macro-Panoan	[133]
Guaraní (Gua)	<i>Rio das Cobras</i> (Estado de Paraná, Brasil)	Ecuatorial-Tucanoan, Ecuatorial	[134]
Kaingang (Kain)	<i>Rio das Cobras</i> (Estado de Paraná, Brasil)	Geno-Pano-Caribe, Macro-Ge	[134]
Xabante (Xab)	<i>Rio das Mortes</i> (centro, Brasil)	Geno-Pano-Caribe, Macro-Ge	[133]
Bari (Bari)	Venezuela	Chibchan-Paezan, Chibchan	[134]
Lacandona (Lac)	Chiapas, Méjico	Chibchan-Paezan, Chibchan	[135]
Amerindios Norteamericanos (NA-ind)			[136]
Méjico (Mex)			[134]
Estados Unidos (US)			[134]
Canadá (Can)			[134]
Africanos Americanos (Af-Am)	Nueva York		[137]
Italia (Ita)			[117]
España (Esp)			[117]
Francia (Fra)			[117]
Alemania (Ale)			[138]
Singapur (Sin)	China		[117]
Japón (Jap)	Nishinomiya		[139]
Africanos negros (Af-N)	Sudáfrica		[117]
Estados Unidos caucásicos (US-2)			[117]
Uyгур (NO-Ch)	Noroeste de China		[140]
Bulgaria (Bulg)			[141]
Argelia (Argl)			[142]

Tabla 20
Poblaciones utilizadas para este análisis
La clasificación lingüística se indica sólo para los amerindios [130].

La población de Buenos Aires está conformada por una mezcla de diferentes grupos étnicos, principalmente caucásicos. Según los censos de 1914 y 1947 [143, 144], la población estaba constituida principalmente por ciudadanos de origen italiano, 43%, y españoles, 36%, y minoritariamente por: franceses 3,6 %, rusos 3,2 %, alemanes 1,9 %, turcos 1 % e ingleses 0,6 %. A partir de éstos datos, se creó una población hipotética de italianos, españoles, franceses y alemanes. Para ello, se sumaron las frecuencias alélicas de los locus DRB1, DQA1 y DQB1 descritas en cada uno de estos países y se la multiplicó por la proporción en que cada una de estas poblaciones fue detectada en nuestro medio.

El análisis de esta población hipotética podría permitirnos comprender los efectos producidos por la mezcla de genes. Sin embargo, se debe aclarar que la composición de la población de Buenos Aires sufrió un cambio cualitativo importante originado con la migración interna que ocurrió en Argentina luego del censo de 1947 y que pudo haber modificado drásticamente el contenido de la población de Buenos Aires. Estas migraciones incorporaron principalmente genes indígenas, como se observa en la variabilidad alélica encontrada en ésta población. Una medida aproximada de esta mezcla puede calcularse sumando las frecuencias alélicas de los alelos amerindios (DRB1*0404, 0407, 0411, 0802, 1402, 1406 y 1602). De esta manera, se encontró que la mezcla con genes amerindios en la población de Buenos Aires es de 9,6%. Por este motivo, se le sumó a la población hipotética, con el mismo procedimiento con que se creó ésta, la población de origen Guaraní (tabla 20). Variando la proporción con que se suma esta población indígena a la hipotética y obteniendo las distancias genéticas, se determinó que el 13 % de mezcla, es la proporción que mejor aproxima a la población de Buenos Aires. Esta nueva población hipotética fue la que se utilizó en estos estudios.

La figura 9 muestra los dendogramas realizados con el método de agrupamiento UPGMA, el primero con los genes DRB1, DQA1 y DQB1, el segundo sólo con el gen DRB1. Este análisis presenta dos ramas principales, que separan a los amerindios del resto de las poblaciones. En el análisis con tres genes las poblaciones orientales y

africanas se encuentran en la rama que agrupa los amerindios mientras que en el árbol de DRB1 se agrupan junto a los caucásicos. En el grupo caucásico se encuentra la población hipotética (It-E-Fr) junto a la de Buenos Aires las que a su vez se agrupan con otras poblaciones caucásicas como las dos norteamericanas (US y US-2), la canadiense (Can) y la española (Esp). Este último grupo es muy semejante en los dos árboles realizados por UPGMA.

En ambos árboles, la rama que abarca a los amerindios, agrupa a la población wichi con las poblaciones de tobas y la otra población wichi. Los chiriguano se encuentran junto a los indios xabantes, los que se asemejan a los indios norteamericanos y a los mejicanos mestizos (NA-ind y Mex). La mayor diferencia encontrada entre los dos árboles es el agrupamiento de las poblaciones orientales y africanas dentro de la rama de amerindios, en el caso de analizar los tres genes, o dentro de la rama de caucásicos cuando se analiza sólo el gen DRB1.

Los dendogramas realizados con el método de agrupación del vecino más próximo (N-J), figura 10, no presentan una gran diferencia con el UPGMA. La población de Buenos Aires y la muestra hipotética, a pesar de no separarse, se juntan a la rama de los amerindios, africanos y orientales, en el análisis con los tres genes. En el árbol realizado sólo con el gen DRB1, la población de Buenos Aires se ubica junto al española y la hipotética junto a la italiana. Los amerindios se encuentran agrupados en una sola rama separada del resto de las poblaciones. En el análisis con tres genes, la población wichi se agrupa con la lacandona y la bari. Los chiriguano quedan en una rama entre las poblaciones tobas. Los orientales se agrupan en una misma rama separándose de los amerindios, los que a su vez divergen de los mejicanos. En el análisis con el DRB1 los amerindios también se agrupan en una única rama de la cual divergen dos grupos. Uno abarca las poblaciones wichis y tobas, y el otro a los chiriguano con los indios brasileños y los lacandones y bari.

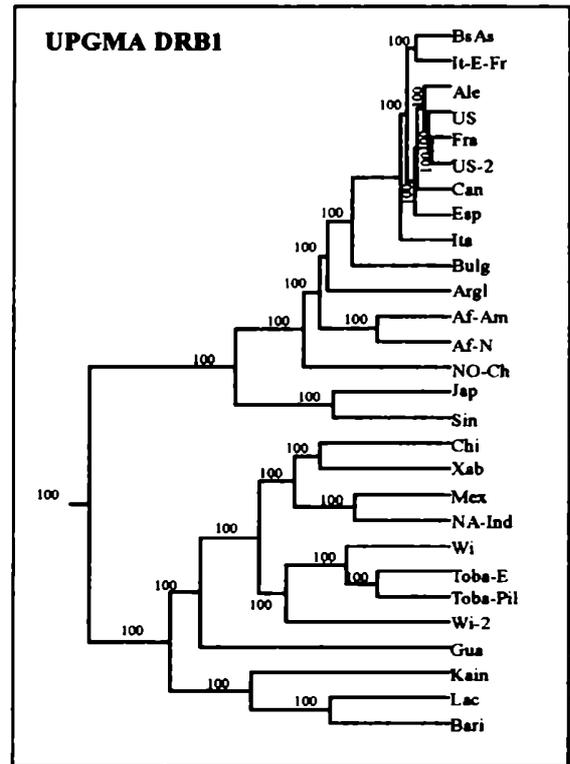
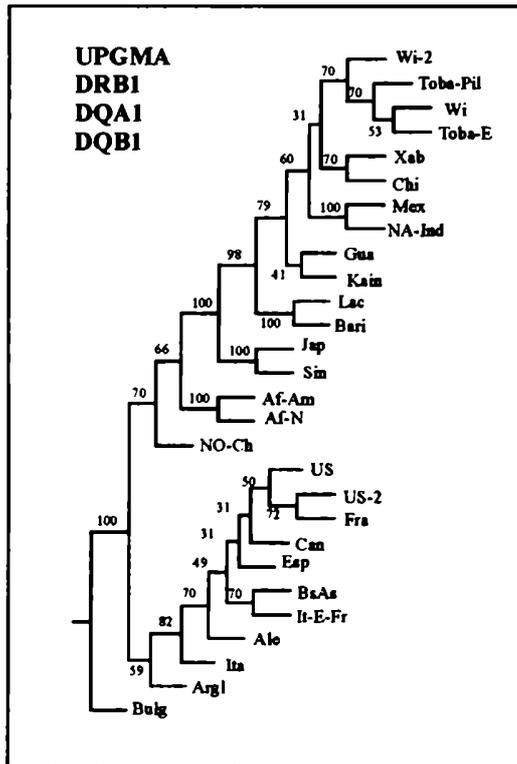


Figura 9
Dendogramas construidos por el método UPGMA a partir de distancias genéticas obtenidas: arriba con los genes DRB1, DQA1 y DQB1; abajo con DRB1. El valor junto a cada bifurcación, es el número de veces que aparecen juntas las poblaciones que se encuentran a la derecha de la bifurcación (realizado por el método de *Bootstrap*)

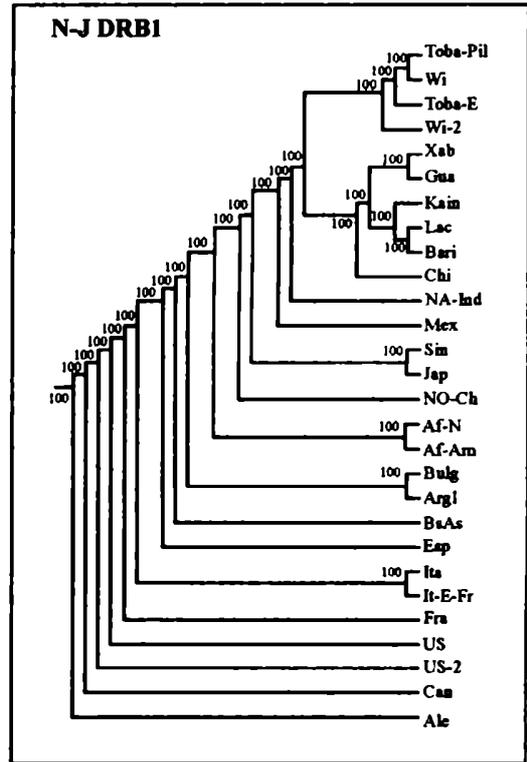
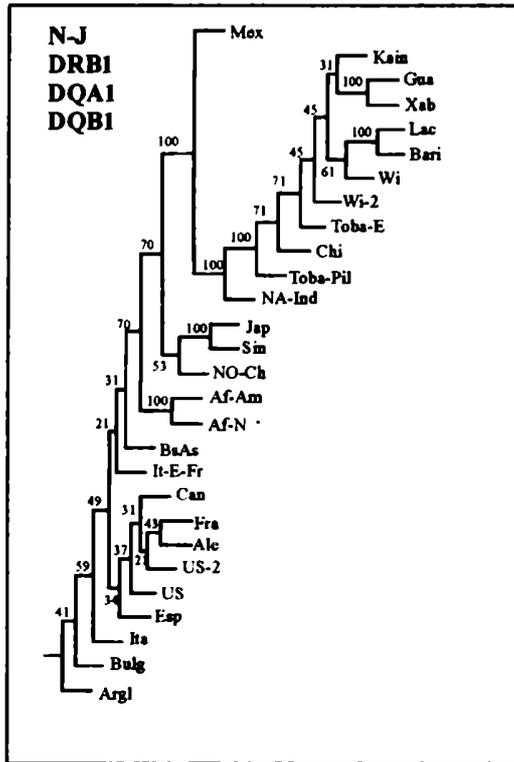


Figura 10

Dendogramas construidos por el método N-J a partir de distancias genéticas obtenidas: arriba con los genes DRB1, DQA1 y DQB1; abajo con DRB1. El valor junto a cada bifurcación, es el número de veces que aparecen juntas las poblaciones que se encuentran a la derecha de la bifurcación (realizado por el método de *Bootstrap*)

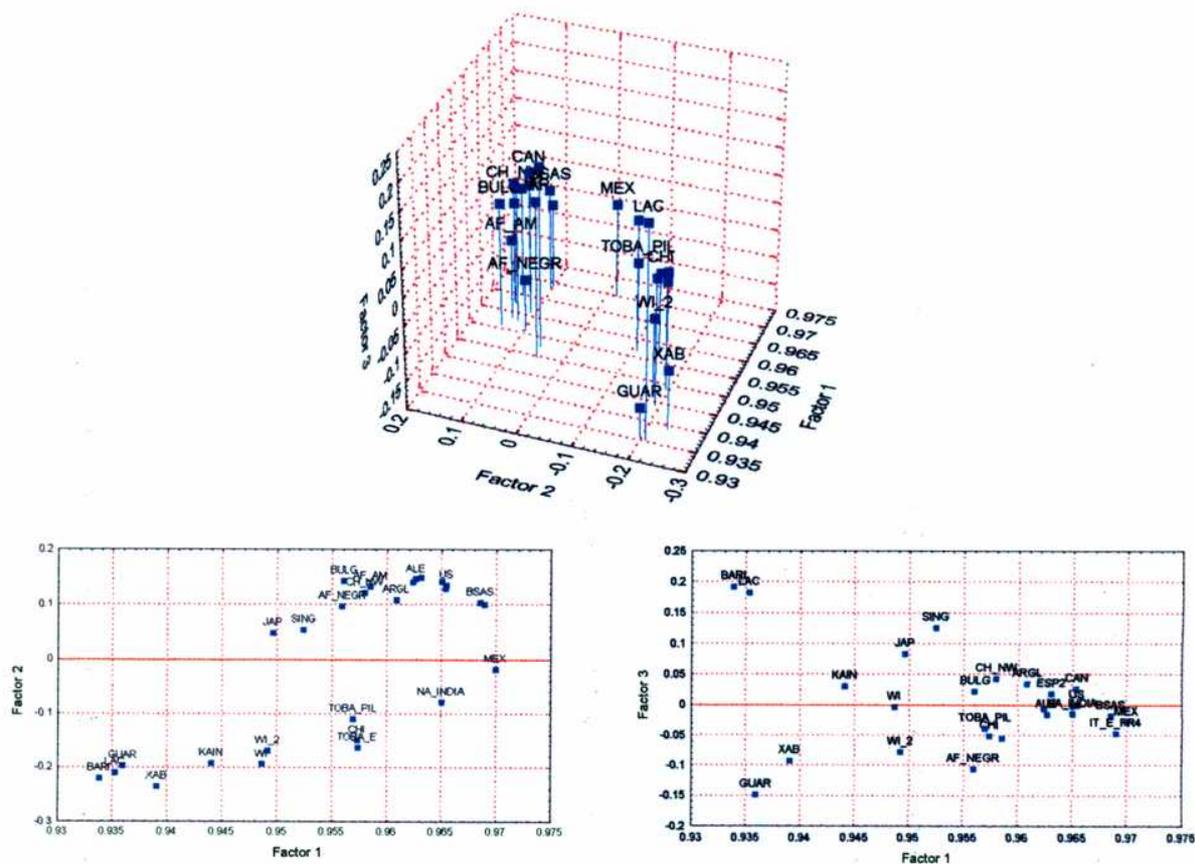


Figura 11

Estudio de componentes principales de todas las poblaciones. En la parte superior se muestra el diagrama en tres dimensiones, el que se sintetiza en los dos diagramas inferiores. El de la izquierda abarca los primer y segundo componentes (factor 1 y factor 2). El de la derecha abarca los primer y tercer componentes (factor 1 y factor 3).

El análisis de componentes principales nos muestra una gran diferencia entre las poblaciones indígenas de América y las demás poblaciones (figura 11). En los primeros dos componentes se puede observar bien esta diferencia, donde también se destaca un ligero alejamiento de las poblaciones de Japón y Singapur. El primer y tercer componentes evidencian aún más las diferencias con los orientales, aunque la población de China del noroeste sigue agrupada con el resto. También se destaca como se agrupan por un lado, los bari y lacandones y por el otro, los guaraníes y xabantes.

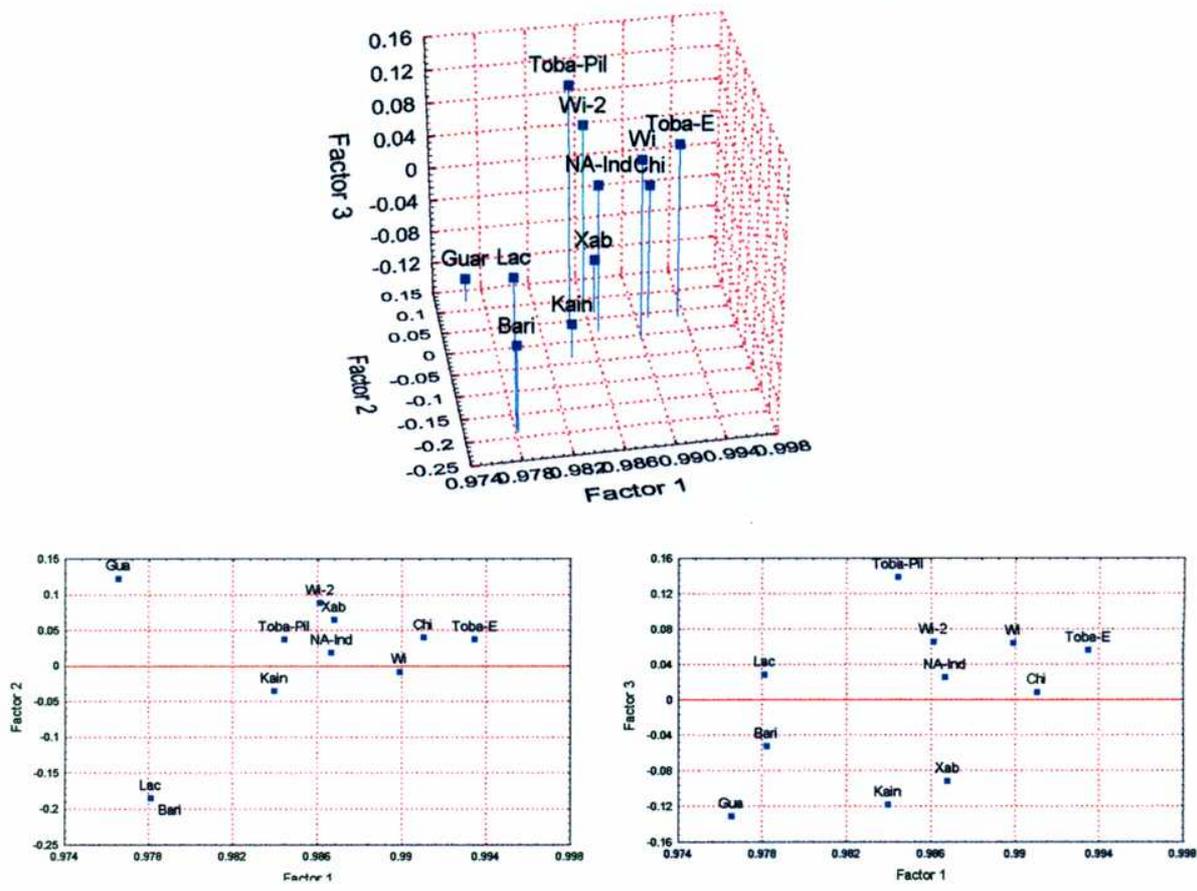


Figura 12
 Estudio de componentes principales de las poblaciones amerindias.

En la figura 12 se analizan sólo los amerindios, donde se puede encontrar a los bari y lacandones otra vez agrupados y a los guaraníes alejados del resto. Con los primer y tercer componentes se agrupan a los kaingang y xabantes. Los tobas, wichis, chiriguanos e indios norteamericanos se agrupan juntos.

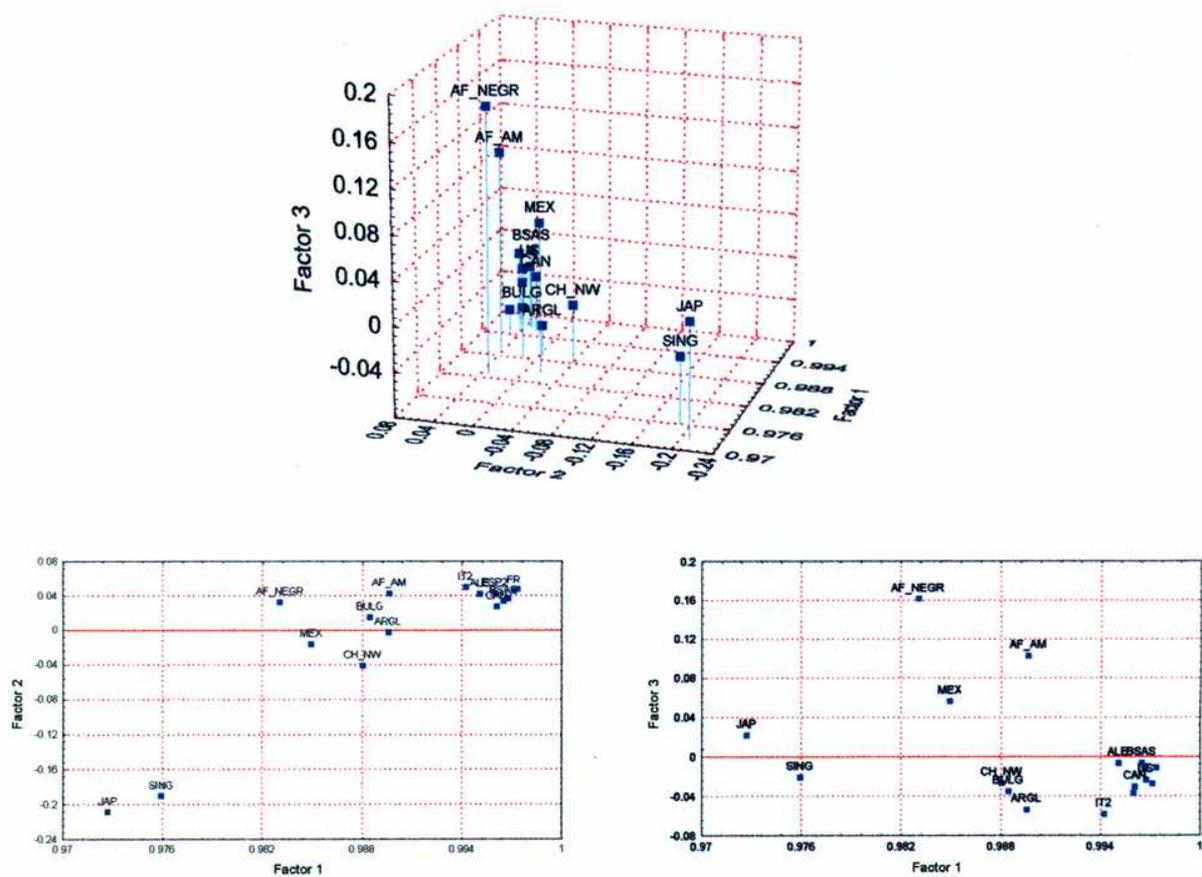


Figura 13
Estudio de componentes principales de las poblaciones excluyendo a los amerindios.

El análisis de las demás poblaciones (figura 13), los primer y segundo componentes, nos muestra una clara separación de los orientales y un grupo que abarca a los africanos, chinos del noroeste, mejicanos y búlgaros. En los primer y tercer componentes, se destaca el alejamiento de varios grupos, por un lado, los africanos negros y los mejicanos y por el otro, un grupo con los búlgaros, chinos del noroeste y argelinos.

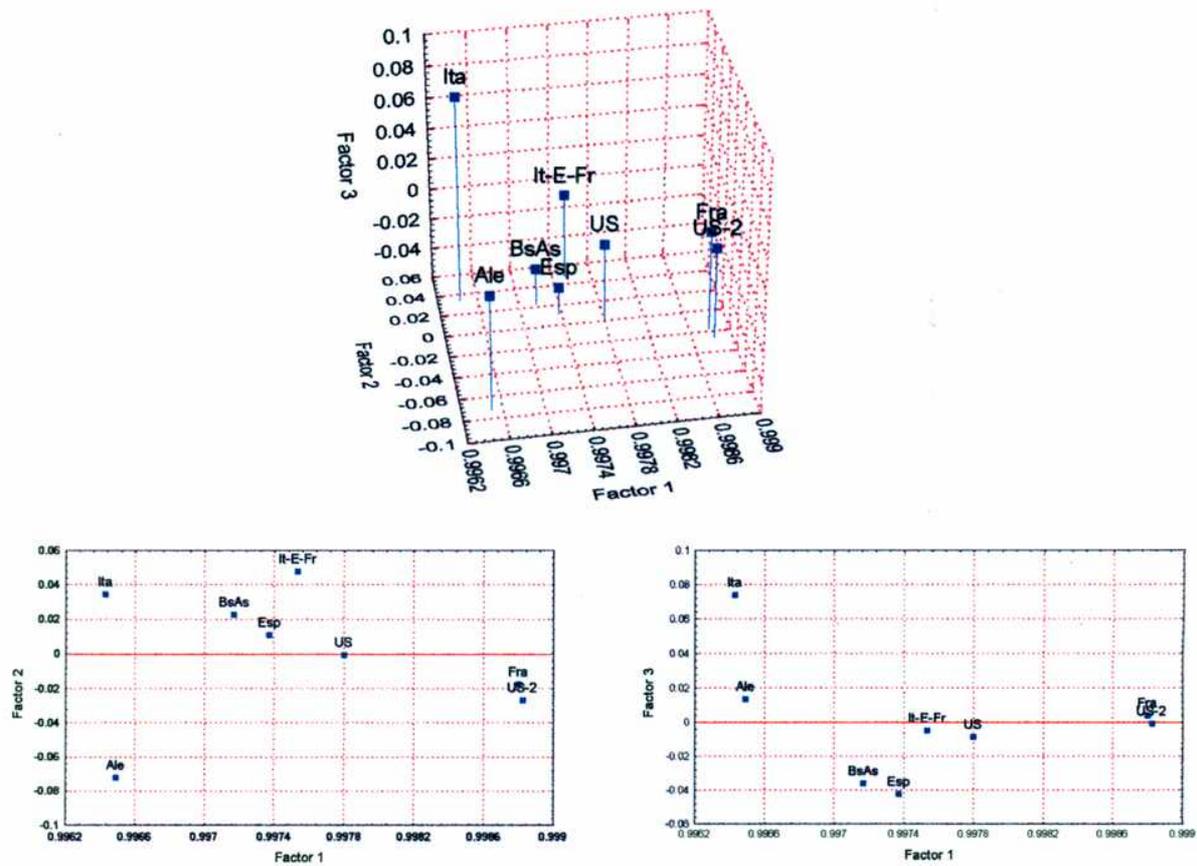


Figura 14
Estudio de componentes principales de las poblaciones caucásicas.

El análisis de las poblaciones caucásicas (figura 14), destaca un grupo que abarca a la poblaciones de Buenos Aires, de Estados Unidos, de España y a la hipotética. Es interesante notar, como se separa la población hipotética de sus poblaciones originarias caucásicas: Italia, España, Francia y Alemania.

Estudio de la asociación de HLA de Clase II en pacientes con HAI

Características generales de los pacientes con HAI-P y HAI-AD.

La edad media de los pacientes con HAI-P es de 9 años \pm 3.8, con un rango de edades de 1 hasta 17 años. En pacientes con HAI-AD la media es de 40 años \pm 9, con un rango de 18 hasta 76 años. En la figura 15 se grafica la distribución de frecuencias relativas de las edades de las dos muestras. Esta distribución, en cada grupo, se aproxima a una distribución normal (figura 15).

La relación de sexos es similar a la ya descrita en otros estudios. En pediátricos la relación hombre:mujer es de 1:7 mientras que en adultos es de 1:5 (figura 16).

En la mayoría de los casos, el inicio de la enfermedad se presenta como una hepatitis aguda. Como se mencionó en la introducción, la presencia de anticuerpos anti-músculo liso (ASMA) y/o anti-núcleo (ANA) definen a la HAI de tipo I. En los dos grupos estudiados, aproximadamente el 50 % de los pacientes es positivo para los dos anticuerpos, el resto presentan un solo anticuerpo. En pediátricos, del 50 % restante, sólo el 5 % es positivo para el ANA, el resto es ASMA positivo. En cambio en los adultos, tanto el ASMA como el ANA son positivos en los dos 25 % restantes (tabla 21). Esto origina una diferencia importante entre los dos grupos, presentando en el grupo pediátrico un 95 % de positividad para el ASMA contra un 75 % en los pacientes adultos.

ASMA	ANA	HAI-AD (N)	HAI-P (N)
+	+	48 % (40)	50 % (61)
+	-	25 % (21)	45 % (55)
-	+	27 % (23)	5 % (6)

Tabla 21.

Porcentajes de pacientes con los anticuerpos ASMA y ANA. Entre paréntesis el número de pacientes.

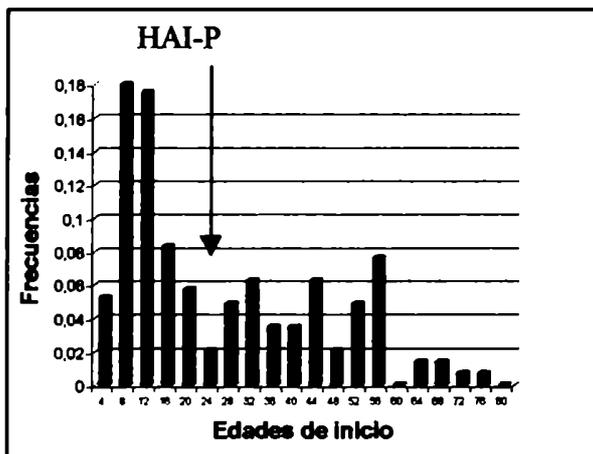


Figura 15.

Distribución de frecuencias relativas de las dos muestras de pacientes con HAI de tipo I. Los valores de edades son el límite superior del intervalo.

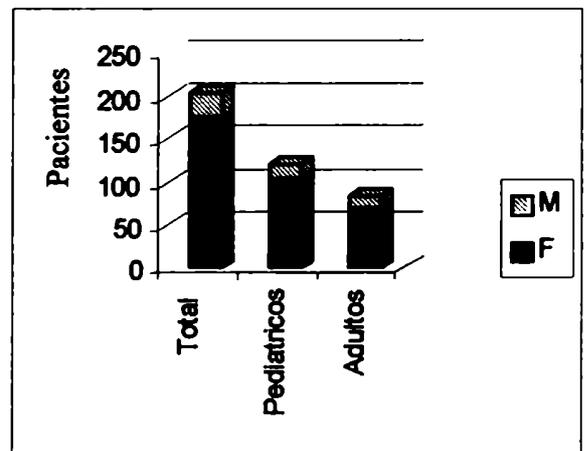


Figura 16.

Relación hombre:mujer en pacientes con HAI de tipo I

Se ha descrito que el 48 % de los pacientes con HAI de tipo I exhiben algún tipo de enfermedad asociada de naturaleza autoinmune [80]. Las enfermedades extrahepáticas más comunes son la tiroiditis, colitis ulcerosa, artritis reumatoidea y el síndrome de Sjögren. En nuestros pacientes adultos encontramos 24 (29 %) con enfermedades extrahepáticas de los cuales 4 (5 %) poseen más de dos enfermedades (tabla 22). Asimismo, 14 (11 %) de los pacientes pediátricos manifiestan también enfermedades extrahepáticas y 4 (3 %) con más de dos (tabla 22).

	Artritis	Tiroiditis	Anemia	Trombocitopenia	Enfermedad Celiaca	Enfermedad de piel
HAI-AD	12 (14,3%)	9 (10,7%)	3 (3,6%)	1 (1,2%)	1 (1,2%)	3 (3,6%)
HAI-P	7 (5,7%)	4 (3,3%)	0 (0%)	3 (2,5%)	0 (0%)	5 (4,1%)

Tabla 22.

Pacientes con enfermedades extrahepáticas en los grupos de HAI-P y HAI-AD.

Análisis del locus DRB1 a nivel genérico

Debido a que la definición de paciente pediátrico y adulto es muy ambigua y que no existe un punto de corte claro en la edad que distinga a los dos, sino que éste se encuentra alrededor de los 15-20 años, decidimos poner un punto medio de corte arbitrario de 17 años. De esta manera, tenemos dos tipos de muestras, una de pediátricos menores o iguales a 17 años (122 pacientes), HAI-P, y una muestra de adultos, mayores de 17 años (84 pacientes), HAI-AD.

El análisis del locus DRB1 a nivel de especificidades serológicas, denominado DR genérico, mostró diferencias con lo descrito en otras poblaciones. El primer antígeno que muestra una diferencia es el DR 4 el cual tiene aumentada su frecuencia en aproximadamente un 8% en los pacientes pediátricos, sin embargo esta diferencia no llega a ser significativa (tabla 23). En los adultos, el antígeno DR 4, se encuentra

aumentado, mostrando un RR muy pequeño, de 1,8. El DR 13 es el antígeno más aumentado en los pacientes pediátricos (67 contra 23 % en los controles), presentando un Pc muy significativo. Este antígeno, no descrito anteriormente asociado a HAI, posee un riesgo relativo considerable (RR= 6,83) de gran significancia estadística y es el marcador más importante encontrado en este análisis. En los pacientes adultos, el DR13 se encontró aumentado sólo en un 9%, con un P no significativo.

Mackay y col.[96] mostraron en sus estudios una reducción en la frecuencia de los antígenos DR 5 y DR 2. En nuestro estudio la menor frecuencia encontrada fue en los antígenos DR 11 (un subtipo del DR 5) y DR 7, en los dos grupos de pacientes, aunque sólo fue significativo en los pacientes pediátricos (tabla 23).

DR genérico	Normal (N= 208)		HAI-P (N= 122)			HAI-AD (N= 84)		
	N antig.	Frec antig.	N antig.	Frec antig.	PC	N antig.	Frec antig.	PC
01*	32	15,38%	13	10,66%	NS	11	13,10%	NS
03*	43	20,67%	31	25,41%	NS	23	27,38%	NS
04*	47	22,60%	38	31,15%	NS	29	34,52%	< 0,05*
07*	53	25,48%	13	10,66%	<0,05	10	11,90%	NS
08*	29	13,94%	10	8,20%	NS	13	15,48%	NS
09*	8	3,85%	6	4,92%	NS	1	1,19%	NS
10*	5	2,40%	0	0,00%	NS	4	4,76%	NS
11*	46	22,12%	10	8,20%	<0,05	11	13,10%	NS
12*	4	1,92%	0	0,00%	NS	2	2,38%	NS
13*	48	23,08%	83	68,03%	<2.10 ⁻¹⁴	27	32,14%	NS
14*	19	9,13%	14	11,48%	NS	8	9,52%	NS
15*	40	19,23%	16	13,11%	NS	16	19,05%	NS
16*	20	9,62%	2	1,64%	NS	7	8,33%	NS

Tabla 23.

Frecuencias de DR genérico de los grupos de pacientes, HAI-P y HAI-AD comparadas con el panel normal. NS no significativo. Pc es el P de significancia modificado con la corrección de Bonferroni que es igual a P multiplicado por el número de test realizados, en este caso 13. * el P no se corrigió, puesto que es uno de los alelos asociados, previamente descrito.

Para analizar asociaciones secundarias, se compararon las frecuencias de las muestras de pacientes y de individuos normales, descartando los individuos positivos para el

alelo primariamente asociado, en nuestro caso el DR 13. Con dicha comparación se puede ver si la asociación secundaria es real o sólo un artefacto generado por el aumento del alelo primario. En los casos de las disminuciones en frecuencias del DR 7 y DR 11, se pierden estas asociaciones. En cambio, en esta comparación, aparece un nuevo alelo asociado, el DR 3 (tabla 24).

DR genérico	HAI-P (N= 39)		Normal (N= 160)		
	N antig.	Frec antig.	N antig.	Frec antig.	PC
03*	18	46,2%	35	21,9%	0,025
07*	6	15,4%	44	27,5%	NS
11*	3	7,7%	43	26,9%	NS

Tabla 24.

Frecuencias de DR genérico luego de descartar los individuos positivos para el DR 13. Pc es el P de significancia modificado con la corrección de Bonferroni, el factor de corrección es en este caso 12.

Análisis de los subtipos alélicos del locus DRB1

En poblaciones caucásicas, se demostró, mediante el estudio molecular de los subtipos alélicos HLA asociados a la HAI, que el DRB1*0301 (un subtipo alélico del DR 3) es el más fuertemente asociado. Por otro lado, un estudio japonés, evidenció que el alelo asociado en esa población es el DRB1*0405 (un subtipo del DR 4). En este análisis, el alelo asociado en el grupo pediátrico es el DRB1*1301 (un subtipo del DR 13), el que se encuentra en el grupo pediátrico con una frecuencia del 66 % (N = 81) comparado con un 11 % (N = 22) en los controles (tabla 25). Este marcador presenta un RR de 16,28 lo que demuestra una fuerte asociación, además de una FE

de 0,62, indicando que un 62 % de la enfermedad puede ser explicada por la asociación a dicho alelo. Otro de los alelos que posee una frecuencia aumentada es el DRB1*0411 (un subtipo alélico del DR4), sin embargo el p no llega a ser significativo. Por otro lado, se observan ciertos alelos con frecuencia menor a la que se encuentra en los controles, el DRB1*1302 es el más significativo. Es interesante notar que este alelo se diferencia del DRB1*1301 en un solo aminoácido en la posición 86 (estos resultados serán discutidos ampliamente más adelante). Asimismo, se encuentra que el alelo DRB1*0701 tiene disminuida su frecuencia en los HAI-P, aunque la diferencia no es significativa. El hallazgo de la asociación del alelo DRB1*1301 con los pacientes pediátricos marca una diferencia fundamental con los otros estudios realizados en caucásicos. Secundariamente a este alelo, ya vimos que el DR 3, específicamente DRB1*0301, se encuentra asociado. El análisis para este antígeno descartando los individuos DRB1*1301, muestra un RR de 3,0 con un p menor a 0,05.

En pacientes adultos, el alelo que muestra diferencias con el grupo control es el subtipo alélico del DR 4, el DRB1*0405 (tabla 26). Notablemente este alelo es el mismo descrito en japoneses. Se observa también una mayor frecuencia del DRB1*1301 y una menor del DRB1*1302, como se describió en los pacientes pediátricos, aunque estas diferencias no son significativas.

Alelo DRB1	PACIENTES		CONTROLES		RR	X2	P	Pc
	N	FREC	N	FREC				
0101	10	8,20%	23	11,06%	0,74	0,699	0,403	NS
0102	4	3,28%	6	2,88%	1,18	0,041	0,840	NS
0103	1	0,82%	5	2,40%	0,46	1,081	0,298	NS
0301	31	25,41%	43	20,67%	1,31	0,992	0,319	NS
0401	1	0,82%	12	5,77%	0,19	4,978	0,026	NS
0402	1	0,82%	7	3,37%	0,33	2,107	0,147	NS
0403	5	4,10%	6	2,88%	1,46	0,352	0,553	NS
0404	7	5,74%	7	3,37%	1,74	1,065	0,302	NS
0405	2	1,64%	2	0,96%	1,71	0,295	0,587	NS
0406	1	0,82%	0	0,00%	5,15	1,710	0,191	NS

Alelo DRB1	PACIENTES		CONTROLES		RR	X2	P	Pc
	N	FREC	N	FREC				
0407	7	5,74%	8	3,85%	1,53	0,634	0,426	NS
0408	1	0,82%	4	1,92%	0,56	0,627	0,428	NS
0411	9	7,38%	2	0,96%	6,91	9,822	0,002	NS
0701	14	11,48%	53	25,48%	0,39	9,322	0,002	NS
0801	2	1,64%	7	3,37%	0,56	0,864	0,353	NS
0802	6	4,92%	11	5,29%	0,96	0,022	0,883	NS
0804	1	0,82%	4	1,92%	0,56	0,627	0,428	NS
0807	0	0,00%	5	2,40%	0,15	2,978	0,084	NS
0901	6	4,92%	8	3,85%	1,32	0,217	0,641	NS
1001	0	0,00%	5	2,40%	0,15	2,978	0,084	NS
1101	5	4,10%	25	12,02%	0,34	5,838	0,016	NS
1102	2	1,64%	3	1,44%	1,22	0,020	0,888	NS
1103	0	0,00%	4	1,92%	0,19	2,375	0,123	NS
1104	3	2,46%	12	5,77%	0,46	1,942	0,163	NS
1201	0	0,00%	4	1,92%	0,19	2,375	0,123	NS
1301	81	66,39%	22	10,58%	16,28	111,583	0,000	<10⁻²³
1302	1	0,82%	23	11,06%	0,10	11,952	0,001	0,02
1303	1	0,82%	4	1,92%	0,56	0,627	0,428	NS
1401	4	3,28%	9	4,33%	0,80	0,223	0,637	NS
1402	8	6,56%	7	3,37%	1,99	1,806	0,179	NS
1406	1	0,82%	2	0,96%	1,02	0,017	0,896	NS
1501	14	11,48%	29	13,94%	0,81	0,413	0,520	NS
1502	2	1,64%	7	3,37%	0,56	0,864	0,353	NS
1601	1	0,82%	15	7,21%	0,15	6,810	0,009	NS
1602	1	0,82%	3	1,44%	0,72	0,249	0,618	NS
1605	0	0,00%	1	0,48%	0,56	0,588	0,443	NS

Tabla 25.

Frecuencias alélicas del locus DRB1 en pacientes con HAI-P comparada con las de los controles. En este caso la corrección de Bonferroni se realizó multiplicando por 36.

Alelo DRB1	PACIENTES		CONTROLES		RR	X2	P	Pc
	N	FREC	N	FREC				
0101	4	0,05	23	0,11	0,44	2,826	0,093	NS
0102	6	0,07	6	0,03	2,58	2,753	0,097	NS
0103	1	0,01	5	0,02	0,66	0,438	0,508	NS
0301	23	0,27	43	0,21	1,45	1,539	0,215	NS
0401	5	0,06	12	0,06	1,09	0,004	0,952	NS
0402	4	0,05	7	0,03	1,50	0,322	0,570	NS
0403	4	0,05	6	0,03	1,74	0,638	0,425	NS
0404	4	0,05	7	0,03	1,50	0,322	0,570	NS
0405	9	0,11	2	0,01	10,39	15,699	0,000	0,002
0407	2	0,02	8	0,04	0,71	0,388	0,533	NS
0701	10	0,12	53	0,25	0,41	6,518	0,011	NS
0801	4	0,05	7	0,03	1,50	0,322	0,570	NS
0802	6	0,07	11	0,05	1,42	0,375	0,540	NS
0807	2	0,02	5	0,02	1,12	0,000	0,991	NS
0901	1	0,01	8	0,04	0,42	1,413	0,235	NS
1001	4	0,05	5	0,02	2,07	1,114	0,291	NS
1101	3	0,04	25	0,12	0,31	4,926	0,026	NS
1102	2	0,02	3	0,01	1,78	0,313	0,576	NS
1104	4	0,05	12	0,06	0,88	0,117	0,732	NS
1201	2	0,02	4	0,02	1,38	0,062	0,803	NS
1301	18	0,21	22	0,11	2,31	5,960	0,015	NS
1302	6	0,07	23	0,11	0,65	1,025	0,311	NS
1303	2	0,02	4	0,02	1,38	0,062	0,803	NS
1304	1	0,01	0	0,00	7,49	2,485	0,115	NS
1401	5	0,06	9	0,04	1,45	0,346	0,556	NS
1402	3	0,04	7	0,03	1,15	0,008	0,930	NS
1501	12	0,14	29	0,14	1,05	0,006	0,939	NS
1502	4	0,05	7	0,03	1,50	0,322	0,570	NS
1601	3	0,04	15	0,07	0,54	1,371	0,242	NS
1602	1	0,01	3	0,01	1,05	0,028	0,867	NS
1605	3	0,04	1	0,00	5,94	4,230	0,040	NS

Tabla 26.

Frecuencias alélicas del locus DRB1 en pacientes con HAI-AD comparada con las de los controles. En este caso la corrección de Bonferroni se realizó multiplicando por 31.

Estudio de los loci DQA1 y DQB1

Con el objetivo de examinar otros loci cercanos al DRB1 que pudieran estar más fuertemente asociados a la HAI se decidió investigar los loci HLA DQA1 y DQB1, situados a 80-240 kb del DRB1. Estos dos loci forman haplotipos bien definidos con alelos del gen DRB1 debido al fuerte desequilibrio de ligamiento que presentan estos genes. Estos haplotipos fueron descriptos para el panel normal.

El análisis del locus DQA1 muestra una mayor frecuencia del alelo DQA1*0103 en pacientes con HAI-P (tabla 27). En pacientes adultos, se encuentra sólo una diferencia significativa con la población control, una disminución en la frecuencia del alelo DQA1*0201, el cual se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el DR 7 (tabla 28). Esta disminución está acompañada con la baja de la frecuencia del DR 7 en este grupo, de esta manera se le confiere al haplotipo DRB1*0701-DQA1*0201 un valor de protección. Los alelos DQA1*0102 y el DQA1*0401 se encuentran también con baja frecuencia respecto de los controles. Cuando se extrae los individuos positivos para el alelo DQA1*0103 todas las demás diferencias se hacen no significativas. También se examinaron los alelos del locus DQB1. En este análisis se observa un aumento del DQB1*0603 en el grupo pediátrico (tabla 29). Este alelo se halla con una asociación fuerte y muy significativa.

Alelos DQA1	PACIENTES		CONTROLES		RR	X2	P	Pc
	N	FREC	N	FREC				
0101	16	13,11%	50	24,04%	0,49	5,73	0,017	NS
0102	19	15,57%	64	30,77%	0,42	9,43	0,002	0,01493
0103	70	57,38%	29	13,94%	8,17	69,08	9x10⁻¹⁷	6,6x10⁻¹⁶
0201	10	8,20%	53	25,48%	0,27	14,87	1x10⁻⁰⁴	0,00081
03	48	39,34%	61	29,33%	1,56	3,48	NS	NS
0401	2	1,64%	21	10,10%	0,18	8,48	0,004	0,02511
05	42	34,43%	97	46,63%	0,60	4,70	0,03	NS

Tabla 27.

Frecuencias de alelos del locus DQA1 en pacientes con HAI-P comparados con el panel normal. Pc corregido con un factor de 7.

Alelos DQA1	PACIENTES		CONTROLES		RR	X2	P	Pc
	N	FREC	N	FREC				
0101	21	25,00%	50	24,04%	1,06	0,03	0,86	NS
0102	22	26,19%	64	30,77%	0,81	0,60	0,44	NS
0103	19	22,62%	29	13,94%	1,81	3,28	0,07	NS
0201	9	10,71%	53	25,48%	0,37	7,80	0,005	< 0,05
03	28	33,33%	61	29,33%	1,21	0,45	0,50	NS
0401	12	14,29%	21	10,10%	1,50	1,05	0,31	NS
05	36	42,86%	97	46,63%	0,86	0,34	0,56	NS

Tabla 28.

Frecuencias de alelos del locus DQA1 en pacientes con HAI-AD comparados con el panel normal. Pc corregido con un factor de 7.

Alelos DQB	PACIENTES		CONTROLES					
	N	FREC	N	FREC	RR	X2	P	Pc
0201	45	36,89%	80	38,46%	0,94	0,08	0,77	NS
0301	24	19,67%	80	38,46%	0,40	12,58	0,00	0,0051
0302	30	24,59%	39	18,75%	1,41	1,59	0,20	NS
0303	7	5,74%	24	11,54%	0,49	3,04	0,08	NS
0402	10	8,20%	24	11,54%	0,70	0,93	0,33	NS
0501	15	12,30%	39	18,75%	0,62	2,34	0,13	NS
0502	1	0,82%	15	7,21%	0,15	6,81	0,01	NS
0503	3	2,46%	10	4,81%	0,55	1,12	0,29	NS
0601	2	1,64%	5	2,40%	0,77	0,22	0,64	NS
0602	16	13,11%	36	17,31%	0,73	1,02	0,31	NS
0603	74	60,66%	23	11,06%	12,13	91,15	1,3x10⁻²¹	6x10⁻²⁰
0604	2	1,64%	19	9,13%	0,20	7,24	0,01	NS

Tabla 29.

Frecuencias de alelos del locus DQB1 en pacientes con HAI-P comparados con el panel normal. Pc corregido con un factor de 13.

Debido a que la asociación del DQB1*0603 es similar a la que se encuentra con el alelo DRB1*1301, aunque esta última es ligeramente mayor, se estudió los dos factores con una estrategia desarrollada por Svejaard y Ryder [132]. Este método sirve para distinguir el alelo más fuertemente asociado. En la tabla 30 se realiza una serie de seis comparaciones a partir de una tabla de 4 x 2, donde se encuentran ambos factores en pacientes y controles. En las primeras dos comparaciones, se presenta la asociación de cada factor por separado. El OR de las comparaciones 3 y 4 es alto, lo que indica la independencia del factor A, el DRB1*1301, demostrando que este factor

contribuye a la susceptibilidad a la HAI-P independientemente del factor B, el DQB1*0603. En las comparaciones 5 y 6, el OR es bajo, lo que señala que el factor DQB*0603 no actúa independientemente del DRB1*1301. De estos resultados se obtiene una fuerte evidencia de que el factor DRB1*1301 es el más fuertemente asociado y que el DQB1*0603 estaría asociado de forma secundaria, indudablemente debido al fuerte desequilibrio de ligamiento existente entre estos dos marcadores. Debido a que algunos de los valores p no son significativos sería conveniente un estudio más amplio para transformar estas evidencias en una conclusión definitiva.

Factor A (DRB1*1301)	Factor B (DQB1*0603)	Pacientes N = 122	Controles N = 208
+	+	74	21
+		7	1
	+	0	2
		41	184

	OR	a	b	c	d	X2	P	Pc
1) A vs no-A	16,28	81	41	22	186	111,6	$4,4 \times 10^{-26}$	
2) B vs no-B	12,13	74	48	23	185	91,15	$1,33 \times 10^{-21}$	
3) ++ vs -+	17,33	74	0	21	2	6,57	0,0104	NS
4) +- vs --	22,23	7	41	1	184	22,67	$1,93 \times 10^{-6}$	$1,74 \times 10^{-5}$
5) ++ vs +-	0,69	74	7	21	1	0,62	0,4323	NS
6) -+ vs --	0,89	0	41	2	184	0,45	0,5048	NS

Tabla 30.

Análisis de asociación de dos factores a HAI-P, el DRB1*1301 y el DQB1*0603. Los OR (*Odd's Ratio*) fueron calculados por el método de Woolf modificado por Haldane, $OR = [(a + 0.5)(d + 0.5)] / [(b + 0.5)(c + 0.5)]$.

En pacientes con HAI-AD, el análisis del locus DQB1 no exhibe diferencias con el panel normal. A pesar de que el alelo DQB1*0302 está íntimamente ligado a la mayoría de los DR 4 (alelo aumentado en este grupo), este no evidencia un cambio significativo, esto, probablemente, sea el resultado del pequeño n de la muestra. El alelo DQB1*0201, en fuerte desequilibrio de ligamiento con el DR 7, no se encuentra disminuido, como era de esperar. Esto se debe a que este alelo no sólo se presenta con el DR 7 sino que también con el DR 3, el cual se encuentra levemente aumentado.

Alelos DQB	PACIENTES		CONTROLES		RR	X2	P	Pc
	N	FREC	N	FREC				
0201	33	39,29%	80	38,46%	1,04	0,02	0,90	NS
0301	18	21,43%	80	38,46%	0,44	7,79	0,01	NS
0302	25	29,76%	39	18,75%	1,84	4,24	0,04	NS
0303	1	1,19%	24	11,54%	0,14	8,18	0,00	NS
0402	11	13,10%	24	11,54%	1,18	0,14	0,71	NS
0501	15	17,86%	39	18,75%	0,96	0,03	0,86	NS
0502	6	7,14%	15	7,21%	1,03	0,00	0,98	NS
0503	7	8,33%	10	4,81%	1,83	1,36	0,24	NS
0601	4	4,76%	5	2,40%	2,07	1,11	0,29	NS
0602	13	15,48%	36	17,31%	0,89	0,14	0,70	NS
0603	17	20,24%	23	11,06%	2,05	4,27	0,04	NS
0604	5	5,95%	19	9,13%	0,67	0,80	0,37	NS

Tabla 31.

Frecuencias de alelos del locus DQB1 en pacientes con HAI-AD comparados con el panel normal. Pc corregido con un factor de 13.

Análisis del locus DRB3

El gen DRB3, de escaso polimorfismo, se ubica cercano al DRB1. Este gen DRB3, cuyo producto se lo denomina DR52, no se encuentra presente siempre en todo genoma, sino que sólo en determinados haplotipos. El grupo del DR52, o sea los haplotipos que poseen el gen DRB3, abarca las especificidades DR3, DR5 (DR 11 y DR 12) y el DR 6 (DR13 y DR14) del gen DRB1. Debido a que el antígeno más fuertemente asociado (DRB1*1301) pertenece a este grupo, se decidió examinar también el locus DRB3.

De los cuatro alelos encontrados en los pacientes con HAI-P, el DRB3*0101 es el de mayor asociación con la enfermedad (tabla 32), aunque el riesgo relativo encontrado es mucho menor al del DRB1*1301. El alelo DRB3*0301 se encontró disminuido, así como también el alelo DRB3*0202, pero estos dos pierden su significancia estadística cuando estudiamos las muestras excluyendo el alelo DRB3*0101. El alelo DRB3*0201 se encontró asociado secundariamente, cuando se excluye al DRB3*0101. Este hecho, puede deberse a que no todos los DRB1*1301 se asocian al DRB3*0101, observándose que todos los DRB3*0201 encontrados son DRB1*1301.

Alelos DRB3	PACIENTES		CONTROLES		RR	X2	P	Pc
	N	FREC	N	FREC				
0101	62	67,4%	49	40,8%	2,96	14,72	10 ⁻⁴	0,0005
0201	6	6,5%	2	1,7%	3,562	3,38	0,066	NS
0202	36	39,1%	69	57,5%	0,479	7,03	0,008	0,0321
0301	0	0,0%	16	13,3%	0,034	13,27	3 x 10 ⁻⁴	0,0011

Tabla 32.

Frecuencias de alelos del locus DRB3 en pacientes con HAI-P comparados con el panel normal. Pc corregido con un factor de 4.

En adultos, ninguno de los alelos de este locus se encontró asociado (tabla 33).

Alelos DRB3	PACIENTES		CONTROLES		RR	X2	P	Pc
	N	FREC	N	FREC				
0101	15	35,71%	49	40,83%	0,81	0,34	0,56	NS
0201	2	4,76%	2	1,67%	2,93	1,24	0,27	NS
0202	27	64,29%	69	57,50%	1,31	0,59	0,44	NS
0301	6	14,29%	16	13,33%	1,13	0,02	0,88	NS

Tabla 33.

Frecuencias de alelos del locus DRB3 en pacientes con HAI-AD comparados con el panel normal. Pc corregido con un factor de 4.

Análisis de subgrupos definidos por los anticuerpos ASMA y ANA

Con el objetivo de estudiar si la presencia de los anticuerpos anti-músculo liso (ASMA) y/o anti-núcleo (ANA) se encuentra asociada a algún tipo HLA específico, subdividimos en grupos según el tipo de anticuerpo presente. Cada subgrupo fue comparado con los otros del mismo grupo, ya sea HAI-P o HAI-AD, para analizar diferencias en las frecuencias antigénicas del gen DRB1. Los subgrupos estudiados no mostraron diferencias significativas (tabla 34).

ASMA	ANA	HAI-P	HAI-AD
+	+	NS	NS
+	-	NS	NS
-	+	NS	NS
+	+/-	NS	NS
+/-	+	NS	NS

Tabla 34.

Diferencias genéticas a nivel de DR entre subgrupos definidos por la presencia o ausencia de los anticuerpos ASMA y ANA en pacientes con HAI-AD y HAI-P.

Variaciones en la secuencia aminoacídica

Estudios previos mostraron que ciertas regiones de la secuencia aminoacídica del dominio $\beta 1$ (exón 2) de la cadena DR β conferían una mayor susceptibilidad a la enfermedad. Los residuos involucrados que tenían la frecuencia aumentada con respecto a los controles eran E9, L67 y K71 [104]. En este mismo trabajo observaron una reducción en las frecuencias de los residuos G30, A73 y T77. En la población japonesa los residuos implicados fueron V11 y H13, los que caracterizan a los alelos del grupo del DR 4 [106]. Secundariamente, este grupo, encontró una asociación con el DR 2. Como consecuencia de que únicamente estas dos especificidades, DR 2 y DR 4, en la posición 13 presentan un residuo básico (R y H respectivamente), se postuló la hipótesis de que esta posición cumple un papel importante en la patogénesis de la HAI.

En la población de HAI pediátrica se estudió si estos aminoácidos se encontraban involucrados en la susceptibilidad a la enfermedad. La presencia o ausencia de cada residuo a estudiar, en un determinado paciente, se consiguió a partir de la secuencia publicada de ADN genómico de cada alelo. De esta manera, se obtuvo la frecuencia de cada residuo o de un motivo aminoacídico. El primer motivo estudiado “LLEQKRGRVDN” (posición 67-77), que es característico de los que son DR 3 y

del DRB3*0101, mostró un significativo aumento, aunque la fuerza de la asociación no es tan grande comparada a la ya encontrada con el alelo DRB1*1301 (tabla 35). Cada una de las posiciones polimórficas de esta región se encontró asociada a la susceptibilidad con una fuerza similar al primer motivo (tabla 35). Es importante destacar que cada uno de estos residuos abarca un grupo de alelos. Por ejemplo, el residuo Q70, se encuentra en todos los alelos DR 1 (menos el DRB1*0103), en los DR 15, en los DR 3, en los DR 4 (menos el DRB1*0402), en el DRB1*1107, en los DRB1*1402, 1406 y 1409, y en todos los alelos del gen DRB3.

Posición en exón 2 DRB1 y DRB3	Motivo o residuo	HAI-P (N=105)	Panel normal (N=196)	RR	X2	Pc
67-77	LLEQKRGRVDN	69	61	4,2	33,3	$< 10^{-6}$
67	L	100	161	4,0	10,2	$< 0,05$
70	Q	100	176	2,1	2,6	NS
71	K	69	61	4,2	33,3	$< 10^{-6}$
73	G	94	144	3,0	10,6	$< 0,05$
74	R	69	61	4,2	33,3	$< 10^{-6}$
77	N	92	120	4,3	22,9	$< 10^{-4}$

Tabla 35.

Residuos de los genes DRB1 y DRB3 involucrados en la asociación a HAI-P. El número de pacientes y de panel normal es el que se le realizó la tipificación para los loci DRB1 y DRB3.

El análisis de los alelos del gen DRB1 dio como resultado una clara asociación con el alelo DRB1*1301. Por otro lado, el DRB1*1302 se mostró como un alelo protector. Como se mencionó anteriormente, estos dos alelos difieren únicamente en un residuo en la posición 86 (figura 17). Este residuo es uno de los involucrados en la unión del péptido antigénico, modulando la entrada del residuo de anclaje en el bolsillo 1 (p1) del péptido antigénico [14]. De esta manera, es muy probable que este residuo, V86 del DRB1*1301 sea uno de los asociados a la susceptibilidad. Por otro parte, a este residuo se lo encuentra en casi un 45 % de los alelos del gen DRB1, por lo tanto se

presume que no debe ser el único vinculado a la enfermedad. El análisis del grupo HAI-P mostró que el 97 % de los pacientes tenían el residuo V86, comparado con el 87 % del panel normal, presentando una fuerza de asociación de $RR = 4,6$ (tabla 36). A pesar de no exponer un alto riesgo, este residuo explica un 78 % de la enfermedad ($FE=0,78$) comparado con 62 % que explica el alelo DRB1*1301.

	10	30	47	70	86
consenso	FLWQLKFEC..VRLLERCIYNESVR..GEYRA..DLLEQRRR..GVGESFT				
DRB1*1301	--EYSTS---	---F-D-YFH--	N---F---	-I--DE---	---
DRB1*1302	--EYSTS---	---F-D-YFH--	N---F---	-I--DE---	---

Figura 17.

Secuencias de los alelos DRB1*1301 y DRB1*1302. Los puntos indican las zonas en las cuales se omitió secuencias que son totalmente homólogas. Los guiones indican homología con la secuencia consenso.

Suponiendo que el residuo 86 estuviese asociado y que éste no fuera el único residuo involucrado en la asociación, se decidió estudiar la asociación de este residuo en combinación con otros relacionados con el resto de los bolsillos de unión del péptido antigénico. De esta manera, se analizó el residuo V86 del bolsillo 1 (p1) con residuos de los bolsillos 2, 3, 4 y 5. Se comparó la secuencia del DRB1*0301, secundariamente asociado a la HAI-P, con las del DRB1*1301, a fin de hallar homologías a nivel de los bolsillos de unión. En el bolsillo 2, que abarca mayoritariamente residuos de la cadena β , sólo el residuo S13 es compartido por los alelos DRB1*1301 y el *0301. Por tal motivo, tomamos la S13 como el posible residuo relacionado con la susceptibilidad. La fuerza de asociación de los bolsillos 1 y 2 es similar a la obtenida en las demás comparaciones, así como el porcentaje de explicación de la asociación dado por la fracción etiológica (FE). A nivel del bolsillo 3 las cadenas β de ambos alelos comparten los residuos Y10 y S11. La combinación

de este bolsillo con el 1, muestra un resultado semejante al del bolsillo 2. En los bolsillos 4 y 5, se encontró disminuida la fuerza de asociación con respecto a los anteriores. La asociación más fuerte encontrada es aquella en la que se combinan los residuos de los bolsillos 1, 2 y 3. Estos residuos, que están en casi un 85 % de los pacientes, presenta un riesgo relativo de 9,3, que es uno de los riesgos más altos encontrados para estas combinaciones. Aunque esta fuerza de asociación no es tan alta como la del alelo DRB1*1301, presenta una fracción etiológica de 0,76, con lo cual se explica la susceptibilidad en un 76%.

Bolsillos involucrados	Residuos	HAI-P N=105(%)	Panel normal N=196(%)	RR	FE	X2	Pc
p1	V86	102 (97)	170 (87)	4,6	0,78	8,5	< 0.05
p1-p2	S13-V86	90 (86)	85 (43)	7,6	0,75	50,4	< 10 ⁻¹¹
p1-p3	Y10-S11-V86	90 (86)	83 (42)	7,9	0,75	52,6	< 10 ⁻¹¹
p1-p4	D28-F47-V86	91 (87)	97 (49)	6,3	0,74	44,2	< 10 ⁻⁹
p1-p5	E9-D57-V86	90 (86)	92 (47)	6,6	0,73	43,0	< 10 ⁻⁹
p1-p2-p3	Y10-S11-S13-V86	89 (85)	72 (37)	9,3	0,76	63,4	< 10 ⁻¹⁴

Tabla 36.

Residuos del gen DRB1 asociados a HAI-P.

Asociación de dos loci con HAI-AD

En 1994, nuestro laboratorio describió una asociación de la HAI en pacientes adultos con manifestaciones extrahepáticas, con los loci HLA-DRB1 y HLA-A. Las especificidades DR 4 y A 11, fueron encontradas aumentadas en estos pacientes [108]. Estos estudios se repitieron con técnicas de tipificación molecular. Para la determinación de la especificidad del A 11 se usó el par de primers específicos descritos en materiales y métodos. La estrategia utilizada es la misma que se usó en el análisis del DRB1*1301 y del DQB1*0603 en pacientes pediátricos [132].

De los 21 pacientes analizados con manifestaciones extrahepáticas 5 (24 %) fueron positivos para el DR 4 y el A 11, comparado de los 105 controles estudiados que fueron negativos, mostrando un RR de 70,3. El análisis realizado muestra que el DR 4 solo, se encuentra levemente asociado, mientras que el A 11 muestra una mayor asociación (tabla 37). Por el contrario, el A 11 se encuentra altamente asociado a este grupo. En las comparaciones 3 y 4 se observa que el antígeno DR 4 se encuentra asociado en mayor grado cuando está presente el A 11 (comparación 3, tabla 37). También, el A 11 se lo encuentra más asociado cuando está presente el DR 4 (comparaciones 5 y 6). Evidentemente, estos dos antígenos actuarían de forma sinérgica como se demuestra en la comparación 7, donde el OR es mucho mayor que la suma de los OR de cada marcador por separado. Dicho de otra manera, el riesgo de padecer la enfermedad si se posee el DR4 y el A11 esta altamente incrementado en comparación a poseer uno sólo de dichos antígenos.

Factor A (DR 4)	Factor B (A 11)	Pacientes N = 21	Controles N = 105
+	+	5	0
+	-	5	28
-	+	4	6
-	-	7	71

	OR	a	b	c	d	Fisher	Pc
1) A vs no-A	2,48	10	11	28	77	4×10^{-2}	
2) B vs no-B	11,63	9	12	6	99	5×10^{-5}	9×10^{-4}
3) ++ vs -+	15,89	5	4	0	6	4×10^{-2}	NS
4) +- vs --	1,84	5	7	28	71	2×10^{-1}	NS
5) ++ vs +-	57,00	5	5	0	28	5×10^{-4}	0,005
6) +- vs --	6,60	4	7	6	71	2×10^{-2}	NS
7) ++ vs --	104,87	5	7	0	71	3×10^{-5}	2×10^{-4}

Tabla 37.

Análisis de la asociación de dos factores con HAI-AD: DR 4 y A 11. Los OR (*Odds Ratio*) fueron calculados por el método de Woolf modificado por Haldane, $OR = [(a + 0.5)(d + 0.5)] / [(b + 0.5)(c + 0.5)]$.

Distribución de frecuencias antigénicas de DR en pacientes con HAI en grupos de diferentes edades

En este estudio se dividió al grupo de pacientes con HAI de acuerdo al criterio clínico de separación en pediátricos y adultos. La edad de 17,5 años se tomó como punto de corte. Con el objetivo de analizar la varianza genética en los pacientes con HAI, se dividió los 206 pacientes en 4 grupos de edades: menores de 17 años, entre 18 y 32, entre 32 y 48 y mayores de 48 años. En la figura 18 se muestra las diferentes frecuencias de cuatro DRs en distintos grupos de edades. Puede observarse un aumento significativo en el DR 13 en menores de 17 años. Este antígeno disminuye su frecuencia en forma inversamente proporcional a la edad. En los pacientes de 17 a 32 años, es el DR 3 el que se observa aumentado. Por el contrario, el DR4, aumenta su frecuencia en pacientes mayores, alcanzando un máximo en pacientes mayores de 48 años.

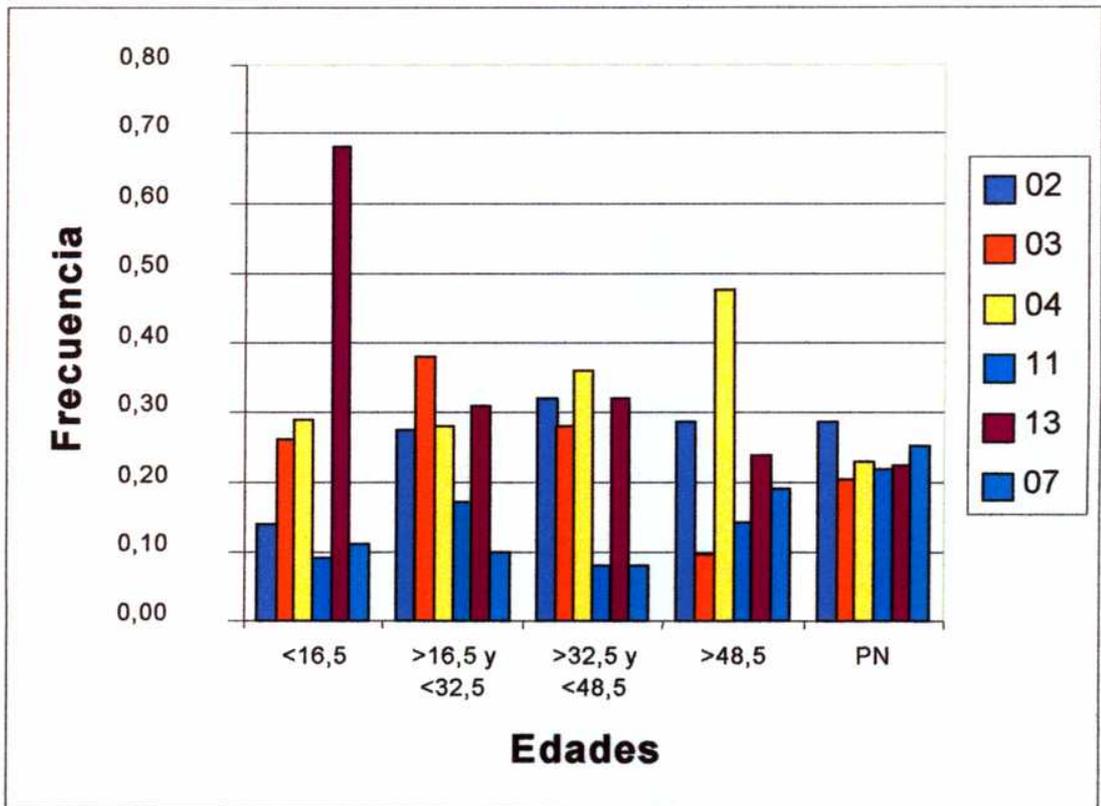


Figura 18.

Frecuencias de los antígenos DR 2, 3, 4, 11, 13 y 7 en pacientes con HAI en grupos de diferentes edades.

* diferencia significativa con respecto al panel normal ($p < 0,05$).

También se analizó el grupo de pacientes menores de 16 años, dividiéndolo en dos grupos, menores de 9 años y de 9 a 16 años. Entre estos dos grupos no se encontró diferencias significativas en las especificidades DR.

Discusión

Discusión del estudio genético de los loci DRB1, DQA1, DQB1 y DRB3 en tres poblaciones Argentinas

En este estudio se describe por primera vez la distribución de frecuencias de los loci de HLA de Clase II, DRB1, DRB3, DQA1 y DQB1 en una población de Buenos Aires y suburbios, así como en dos poblaciones indígenas argentinas de la Provincia de Salta. Hasta hace poco tiempo, la genética de poblaciones del HLA estaba basada en estudios de poblaciones europeas. Estos estudios mostraban que las frecuencias de los alelos HLA variaban entre diferentes poblaciones[117]. La suma de poblaciones, mediante la mezcla de las mismas, es de esperar que produzca cambios en la diversidad alélica y haplotípica. La población nueva, con respecto a las fundadoras, tendrá más alelos, más haplotipos y una distribución de frecuencias diferente. En una población con una gran proporción de mezcla, como lo es la de Buenos Aires, generada por varias migraciones europeas, y migraciones internas, se espera obtener efectos parecidos a los descriptos. El censo de 1947 mostraba 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).

El conocimiento de la estructura de los genes HLA de Clase II en una población local es de vital importancia para el estudio de la asociación de los mismos con enfermedades autoinmunes. Asimismo, tanto la metodología empleada como el estudio de los subtipos alélicos de los genes HLA, son una herramienta importante para la formación de un banco de médula ósea. Hoy en día, los transplantes de

médula ósea entre individuos no relacionados es una alternativa viable para el tratamiento de algunas enfermedades hematológicas. Para tal tarea se debe poder tipificar, tanto al receptor como al donante, los loci HLA de clase I y II a nivel alélico, puesto que una mínima diferencia puede generar un rechazo. La aplicación de tecnologías moleculares para la tipificación de estos loci dan la posibilidad de establecer un banco de médula ósea en nuestro país.

La tipificación genérica de los antígenos DR exhibe una gran diversidad en la población de Bs As, donde se encuentran todos los antígenos, del DR1 al DR 16. Los DR 17 y DR 18, subtipos del DR 3, no son determinados con la tipificación genérica, estos se pueden distinguir con una tipificación específica. En nuestra población, el DR 18 (DRB1*0302), característico de poblaciones negras [137, 145], se halla ausente. Los antígenos DR 3, DR 4, DR 7, DR 11, DR 13, DR 15 son los más frecuentes, cuyas frecuencias alélicas varían entre 9 y 14 %, lo que indica que no existe uno o unos pocos antígenos dominantes (tabla 6). Los DR 9, DR 10 y DR 12, antígenos comunes en Orientales [146, 147], son los únicos que aparecen con muy baja frecuencia. La cantidad de alelos presentes en esta población es de 48, la que, comparada con otras, es muy alta. Se podría pensar, que el número de individuos (n=208) es grande y por lo tanto la proporción de alelos es alta, pero como ejemplo tenemos la muestra Japonesa, con un n de 330 individuos donde se encontraron 31 alelos de DRB1[117] o en otras muestras caucásicas donde con un número similar de individuos el número de alelos ronda los 30. Además, se encuentran alelos no corrientes en poblaciones caucásicas como el DRB1*0404, 0407, 0411, 0802, 1402, 1406 ó 1602 (alelos comunes en amerindios), y alelos raros como el DRB1*1115 (encontrado en una familia Turca[148]) y el DRB1*1605 (encontrado en una familia alemana[149]). Es verdad que muchos alelos tienen una muy baja frecuencia, diez de ellos aparecen sólo una vez, pero por otro lado es de esperar que a tal diversidad existan muchos alelos con baja frecuencia.

Los loci DQA1 y DQB1, con una menor diversidad que el DRB1, se presentan con 7 y 12 alelos respectivamente (tablas 16 y 17). En DQA1, hay un alelo levemente

dominante, el DQA1*05, con casi un 27 % de frecuencia y varios alelos con una frecuencia menor (12 y 17 %). Dos alelos, en DQB1, son los dominantes el DQB1*0201 y el DQB1*0301, con frecuencias del 20 % y el resto menores al 10 %. Esta distribución de alelos en los loci DQ es muy parecida a la encontrada en otras poblaciones caucásicas, inclusive en los alelos más frecuentes [117]. El locus DRB3, uno de los menos polimórficos (7 alelos), presenta 4 alelos, uno de los cuales el DRB3*0202 tiene una frecuencia de 52,3 %, lo que muestra la dominancia del mismo (Tabla 10). La variabilidad encontrada en los loci DQ y DRB3 es muy parecida a la de otras poblaciones caucásicas, lo que hace resaltar mucho más a la encontrada en el locus DRB1. La ausencia de uno o unos pocos alelos dominantes (salvo en DRB3), hace pensar de que estos loci están bajo una fuerza selectiva balanceadora (ventaja del heterocigota o selección dependiente de la frecuencia) [150]. Aunque lo más probable es que estos resultados sean la consecuencia de la mezcla de diferentes poblaciones mas que una presión selectiva. Esta hipótesis esta también apoyada por la gran cantidad de alelos encontrada en comparación con otras poblaciones similares.

El grado de asociación que tienen estos loci es muy alto, como se puede observar en los resultados de desequilibrio de ligamiento (Tablas 12 y 13). Salvo unos pocos alelos DRB1, la mayoría de estos se asocian específicamente a un DQA1 y a un DQB1 determinados. Los alelos que muestran un D' menor que uno (el desequilibrio no es máximo), por lo general se asocian a uno u otro haplotipo DQA1-DQB1 definido. El alelo DRB1*0301 se asocia, en caucásicos, con el haplotipo DQA1*05-DQB1*0201. En nuestra población aparece además, con el haplotipo DQA1*05-DQB1*0301, descrito en una tribu africana [117]. El DRB1*0401, en poblaciones caucásicas, se asocia indistintamente a dos haplotipos, el DQA1*03-DQB1*0301 ó el DQA1*03-DQB1*0302 (este último con menor frecuencia). Similarmente, el DRB1*0701 se asocia con los haplotipos DQA1*0201-DQB1*0201 ó el DQA1*0201-DQB1*0303 (este último con menor frecuencia). El alelo DRB1*0802 se lo encuentra asociado, además de el haplotipo común DQA1*0401-DQB1*0402, con el DQA1*03-DQB1*0302 (relacionado a los DR 4). Este último se lo describe en una población japonesa y en una tribu Toba de Argentina [133, 151]. El haplotipo

DRB1*1302-DQA1*0102 se lo encuentra comúnmente asociado a los DQB1*0604 y DQB1*0501, este último descrito únicamente en una población de negros americanos [137]. El alelo DRB1*1501 se asocia al haplotipo DQA1*0102-DQB1*0602, pero en nuestra población aparece además asociado al DQA1*0101-DQB1*0602, descrito en una población de Estados Unidos y otra del Noroeste de China [117, 140]. Resumiendo, la variabilidad haplotípica exhibida es muy grande, donde encontramos haplotipos poco comunes que sólo aparecen en algunos grupos étnicos. Alguno de estos haplotipos puede ser explicado por recombinación, pero lo más probable es que haya sido incluido por alguna migración.

El análisis de los dendogramas mostró una primera separación de los caucásicos del resto de las poblaciones estudiadas. En los caucásicos, dependiendo del método utilizado, la agrupación de poblaciones presenta algunas diferencias, lo que indicaría que las disparidades genéticas en estos loci no pueden diferenciar con exactitud a poblaciones muy relacionadas. Puede observarse que nuestra población hipotética (It-E-Fr) se ubica cercana a la de Buenos Aires, lo que sucede sólo cuando se le agrega a la población indígena. Los componentes principales muestran resultados similares, agrupando a Buenos Aires junto a las poblaciones española, estadounidense y a la hipotética. Estos resultados muestran como afecta la mezcla de genes en la distribución de frecuencias de los mismos en una población. Además, se infiere que en la población de Buenos Aires el aporte indígena puede llegar a ser de un 13 % aproximadamente.

Se cree que la población de América se originó a partir de un pequeño número de migraciones provenientes de Siberia a través del estrecho de Bering. Evidencias arqueológicas lingüísticas y genéticas sugieren que ocurrieron por lo menos 3 migraciones [130]. El análisis de secuencias de DNA mitocondrial muestra que los haplotipos encontrados en poblaciones amerindias son muy semejantes entre sí, sugiriendo la existencia de un antecesor común, que antecede a la colonización de América [152, 153]. Además, el estudio de la secuencia de un determinado haplotipo del ADN mitocondrial estima que la primer migración ocurrió hace unos 30000 a

43000 años [153]. La mayor semejanza encontrada entre las poblaciones amerindias, esquimales y de los indios Na-Dene que cualquiera de ellas con poblaciones asiáticas sugiere que el primer asentamiento fue en el estrecho de Bering (*Paleo-Indios*) y de ahí se expandieron para originar a los amerindios y en una segunda etapa originar a los esquimales e indios Na-Dene [153]. La primera colonización por *Paleo-Indios* dió origen a los amerindios. Las poblaciones amerindias se caracterizan por una restricción en el número de alelos como se observa en estudios de marcadores como el D1S80, de mtADN y de varios marcadores del cromosoma Y [154-157]. Las dos poblaciones analizadas de indios pertenecen a esta primer migración. Estas poblaciones que provienen de un grupo homogéneo, deberían poseer una diversidad alélica menor que la hallada en la población de Buenos Aires y una distribución de alelos diferentes. Se espera encontrar pocos haplotipos con un gran desequilibrio de ligamiento. Estas características deben ser parecidas a las encontradas en otras poblaciones de amerindios.

Los principales antígenos DR encontrados son los DR 4, DR 8, DR 14 en los chiriguano y wichis, y el DR 16 sólo en los primeros, las frecuencias de éstos son altas, superando todas el 20 %. Estos antígenos son los comúnmente encontrados en otras poblaciones amerindias [117, 118, 158, 159]. Las frecuencias de estos antígenos pueden variar en las diferentes poblaciones, por ej. el DR 4 en los chiriguano y en los wichis tienen 25 % y 63 % respectivamente. Probablemente estas diferencias se deban a deriva génica.

Los alelos del DRB1 se presentan con una menor diversidad en cada linaje que en la muestra de Buenos Aires, más aún, existen linajes ausentes como el DR 3, DR 10 y DR 11 en la población chiriguana y el DR 1, DR 10, DR 12, DR 13, DR 15 y DR16 en wichis, aunque en esta última población puede deberse al bajo número analizado. El linaje del DR 2 se presenta en los chiriguano con el DRB1*1602 con una frecuencia de casi el 18 %, este alelo, ausente en los wichis, se lo encuentra en la mayoría de las tribus amerindias [133, 159-161] y en poblaciones orientales [134]. El linaje del DR 4 se encuentra representado por 4 alelos el DRB1*0404, el

DRB1*0407 no encontrado en wichis, el DRB1*0411 y el DRB1*0417 no presente en chiriguano. Es interesante que el alelo DRB1*0417 se halló sólo en amerindios argentinos, específicamente en dos tribus Tobas y una Wichi [133, 162]. Este alelo es similar al DRB1*0411 con una única diferencia en el codón 86 del exón dos, lo que sugiere que este alelo se halla originado en Sudamérica [133]. El linaje asociado al DRB3 posee dos alelos principales, el DRB1*1402 y el DRB1*1406, ambos presentes en varias tribus amerindias de Sudamérica [133, 159-161]. Sin embargo, el DRB1*1406 está ausente en tribus de América del Norte como la Na-Dene [163], la Bari de Venezuela y la Xabante del centro de Brasil [133, 159]. La población chiriguana presenta el alelo DRB1*1201 con una frecuencia alélica de casi el 5 %, si bien este alelo es común en orientales no se lo encuentra en otras poblaciones de amerindios. Las frecuencias del DRB1*0701 y el DRB1*0901, que son bajas en las dos poblaciones indígenas, son similares a otras poblaciones de amerindios, aunque probablemente sea consecuencia de la mezcla con genes caucásicos. La mezcla con genes caucásicos se observó también en indios wichis, mapuches y tehuelches en un estudio de ocho loci STR [164]. El DR 8 se presenta principalmente con el DRB1*0802, alelo común en la mayoría de las poblaciones de amerindios. De los 12 alelos del locus DRB1 encontrados en wichis, sólo 7 aparecen más de una vez. Además, de los resultados del muestreo al azar del panel de Buenos Aires, donde se obtiene un número mayor de alelos para un número similar de individuos muestreados, se deduce que la diversidad de este locus es mucho menor a la de Buenos Aires. Lo mismo se ha observado en la población chiriguana donde sólo encontramos 19 alelos y en el muestreo al azar también se obtiene un número mayor de alelos. Estos resultados demuestran la baja diversidad alélica que presenta el locus DRB1 en las poblaciones indígenas. Asimismo, varios alelos que aparecen sólo una vez son predominantemente caucásicos, lo cual muestra la mezcla con genes caucásicos.

Los loci DQA1 y DQB1 presentan uno o dos alelos predominantes. En chiriguano los alelos DQA1*05 y el DQB1*0301 son los más frecuentes, superando el 50 % de frecuencia alélica. En wichis los alelos DQA1*03, DQA1*05, DQB1*0301 y

DQB1*0302 son los más frecuentes. Se observa una menor diversidad alélica sólo en wichis, probablemente por el bajo número de individuos.

En wichis, en el estudio de haplotipos se encontraron los seis haplotipos clásicos de amerindios y un haplotipo no descrito, el DRB1*04-DQA1*05-DQB1*0302. Este haplotipo se debe haber formado por un doble evento de recombinación puesto que tampoco se han descrito haplotipos DRB1*04-DQA1*05 ni DQA1*05-DQB1*0302. En chiriguanos se encontraron 14 haplotipos comunes en poblaciones de amerindios y algunos en caucásicos. El haplotipo DRB1*1201-DQA1*0101-DQB1*0501 es poco común, hallándose en poblaciones negras africanas, lo que puede ser un indicio de mezcla con otras poblaciones. El haplotipo poco común DRB1*1602-DQA1*0101-DQB1*0501 es una consecuencia de encontrar dos individuos histoidénticos con la tipificación de DRB1*1602/1201-DQA1*0101/05-DQB1*0501/0301, en donde el haplotipo DQA1*05-DQB1*0301 está comúnmente asociado a los dos alelos DRB1. Como se especula que este haplotipo poco común pertenece al DRB1*1201, por lo tanto, se descarta el otro haplotipo.

El estudio filogenético agrupa a todos los amerindios juntos, lo que demuestra la relación que existe entre estos grupos. Por otro lado, muy cercano a estos grupos, se hallan las poblaciones orientales y más alejadas las africanas, indicando una conexión entre éstas. Las poblaciones de lacandones y de indios bari se las encuentra agrupadas tanto en los dos tipos de dendogramas como en los componentes principales lo que demuestra la coherencia de este grupo. Este resultado se corresponde con la cercanía geográfica y lingüística, en la que estas dos poblaciones pertenecen al subgrupo Chibchan (Tabla 20). Las demás poblaciones indígenas presentan ciertas discrepancias en los estudios. Los xabantes se agrupan con los guaraníes y la tribu Kaingang en el dendograma de N-J así como también en el estudio de componentes principales, mientras que en el UPGMA, los guaraníes se asocian a la tribu Kaingang y los xabantes, más alejados de este grupo, se vinculan con los chiriguanos. Según la clasificación lingüística los xabantes y la tribu Kaingang pertenecen al subgrupo Macro-Ge. Por lo tanto, los datos lingüísticos y la cercanía geográfica de estos grupos

(centro y Sur de Brasil) apoyan la unidad de este grupo. Los chiriguanos pertenecen al subgrupo lingüístico Ecuatorial, el que se encuentra cercano al subgrupo Macro-Panoan, wichis y tobas [130], lo que apoyaría la reunión de estas tribus en un grupo, como sucede en los dendogramas de N-J (con tres genes) y UPGMA. Por otro lado, en el dendograma de N-J se relacionan los wichis y los tobas, así como también en el UPGMA y en los componentes principales. Esta relación se observa en otros estudios [161], aunque estos dos tribus no se diferencian una de la otra.

A nivel general, los métodos utilizados para este análisis muestran un gran parecido en los resultados, aunque presentan ciertas diferencias a mayor resolución. Estas diferencias pueden deberse a la dificultad que existe en encontrar un único método que pueda predecir todos los procesos que afectan a las poblaciones y en especial a estos loci. Los genes HLA se encuentran en desequilibrio de ligamiento. Probablemente estos genes no estén bajo neutralidad selectiva y el polimorfismo de los mismos debe estar mantenido por algún tipo de selección. Además, se especula que las poblaciones que colonizaron América, tuvieron varios cuellos de botella y que pudieron haber padecido enfermedades que las seleccionaran a nivel del HLA. A pesar de esto, los resultados presentan una cierta coherencia lo que indicaría que los procesos que afectaron a la colonización de América fueron los esperados.

Discusión de los estudios sobre la asociación HLA a la Hepatitis Autoinmune

En un trabajo inicial de esta tesis, se publicó la asociación del haplotipo DRB1*1301-DQB1-0603 a pacientes con HAI-P [109], en donde de 52 pacientes, el 66,6 % tuvo este haplotipo. Ampliando la muestra a 122 pacientes con HAI-P, se pudo confirmar la asociación, encontrando un 66,4 % de los pacientes con el haplotipo (RR = 16,3). El gran tamaño de la muestra, incluso, permitió alcanzar nuevas conclusiones que pueden ser relevantes para el entendimiento de la patogénesis de la HAI. Por otro lado, el hecho de que 8 de los pacientes DRB1*1301 no fueran DQB1*0603 muestra la importancia de este alelo. El análisis realizado a partir de la metodología de Svejgaard y Ryder [132] demostró que el DRB1*1301 confiere un riesgo a la HAI independientemente del alelo DQB1*0603. Por el contrario, el DQB1*0603 es incapaz de otorgar susceptibilidad a la HAI independientemente del DRB1*1301, lo que sugiere que el locus DRB1 y no el DQB1 es el locus primario asociado a la enfermedad. Además en este estudio se encontró que secundariamente el alelo DRB1*0301 se encuentra asociado a la enfermedad.

El estudio de pacientes adultos mostró que el alelo asociado es el DRB1*0405 (RR = 10,4), al igual que el encontrado en una población japonesa [106]. A pesar de que la FE es muy baja, 0,10, lo que significa que este alelo explica sólo un 10 % de la población enferma, se lo encuentra, incluso, con una frecuencia baja en la población normal (1 %). En cambio, en Japoneses este alelo es el predominante (25-30 %). La diferencia encontrada en la asociación con alelos HLA entre HAI-P y HAI-AD, no fue la única hallada en este estudio. El anticuerpo ASMA fue el dominante en HAI-P comparado con HAI-AD (95 % contra 73 % respectivamente). En cambio el anticuerpo ANA fue más frecuente en HAI-AD que en HAI-P (75 % contra 55 %). No se conoce el papel de estos anticuerpos en la patogénesis y en el curso de la enfermedad, pero tienen un gran valor diagnóstico. Por otro lado se observa que la presencia de manifestaciones extrahepáticas es más frecuente en HAI-AD que en HAI-P (29 % contra 11 % respectivamente). Un estudio previo de nuestro laboratorio,

realizado con técnicas serológicas, mostraba la asociación de dos loci HLA a la HAI-AD con enfermedades extrahepáticas [108]. Para confirmar este primer hallazgo, se realizó la tipificación del antígeno HLA-A 11, por la técnica de PCR con primers específicos de secuencia, desarrollada por Krausa et. al. [119]. De esta forma se confirmó el fuerte efecto sinérgico de los antígenos HLA-A11 y el DR 4 en la susceptibilidad de la HAI-AD con manifestaciones extrahepáticas.

En estudios en poblaciones caucásicas norteamericanas y noreuropeas, las asociaciones fueron con los alelos DRB1*0301 y DRB1*0401 [100]. Asimismo, en Japón, en pacientes adultos se mostró la asociación con el DRB1*0405. Todos estos estudios apoyan la hipótesis que la HAI en adultos y en pediátricos podrían representar enfermedades diferentes involucrando no sólo una particular asociación genética sino que también factores ambientales. Los resultados obtenidos en los pacientes con HAI-P son concordantes con un estudio realizado en Brasil. Niños brasileños caucásicos de San Pablo, con HAI de tipo I también muestran una fuerte asociación al haplotipo DRB1*1301-DQB1*0603 [165]. Este estudio, realizado en un grupo étnico diferente, da apoyo a la existencia de un factor ambiental común. Argentina y Brasil son regiones endémicas de la infección del virus de la hepatitis A (HAV) en niños [166]. Este virus ha sido identificado como el posible disparador de la HAI [116]. Otras evidencias indican que el HAV es capaz de producir una respuesta inmune contra antígenos virales expuestos en la superficie celular de pacientes infectados [167]. Más recientemente Vento et al, en un estudio retrospectivo, realizó el seguimiento de familiares sanos de pacientes con HAI, donde pudo estudiar la evolución de una hepatitis autoinmune en casos de hepatitis A aguda subclínica [114]. En nuestro Laboratorio, se encontró que la asociación HLA con infecciones autolimitantes y prolongadas del virus HAV, era distinta. La forma prolongada esta fuertemente asociada con el alelo DRB1*1301. Sin embargo, luego de 3 años de seguimiento de estos chicos, ninguno desarrolló una hepatitis autoinmune (manuscrito en preparación). Estos resultados indican que, a pesar de que el alelo DRB1*1301 debe ser el factor primario asociado a la susceptibilidad a HAI-P, otros genes deben asociarse al disparo de la enfermedad.

El alelo DRB1*1301 asociado con la susceptibilidad a HAI-P se distingue del alelo protector DRB1*1302 por la presencia del aminoácido Val en la posición 86 de la cadena DR β . Este aminoácido se encuentra presente en el 45 % de los alelos del gen DRB1, en dos del gen DRB3 y en todos los DRB4 (estos se encuentran en alto desequilibrio de ligamiento con los DR 4, DR 7 y DR 9). Analizando la población normal, el 87 % tiene este residuo en por lo menos una de sus cadenas DR β , mientras que en los pacientes con HAI-P casi el 97 % lo poseen. A pesar de que esto representa un riesgo menor que para el alelo DRB1*1301, la fracción etiológica es mayor para este residuo (0,78 contra 0,62). En un estudio reciente realizado por Strettel et al, confirmaron la asociación del alelo DRB1*0301 y secundariamente del DRB1*0401 en pacientes adultos noreuropeos y Norteamericanos con HAI [105]. Postularon que el residuo Lis 71 de la cadena DR β es el que confiere la mayor susceptibilidad a la HAI. Por otro lado, Ota et al propone que el residuo 13 de la cadena DR β es el involucrado en la susceptibilidad, siendo este un aminoácido básico en todos los alelos asociados en su población. A partir de la estructura tridimensional de el antígeno DR 1 presentando un péptido del virus de influenza, se observó que este péptido se encuentra anclado a la molécula DR por ciertos residuos. Las cadenas laterales de estos residuos del péptido se ubican en ciertas cavidades o “bolsillos” de la molécula DR 1 los que retienen el péptido. Las paredes de los bolsillos están formadas por aminoácidos de la molécula DR , que interactúan con los residuos de anclaje del péptido. Se describieron 16 residuos de la molécula DR 1, involucrados en este anclaje. Cuando se analizó las secuencias alineadas de los alelos DRB1, DRB3 , DRB4 y DRB5, se comprobó que 13 de los residuos involucrados en la especificidad de unión de un péptido por una determinada molécula DR son altamente polimórficos. En el caso que nos ocupa, los alelos DRB1*1301 y DRB1*0301, alelos asociados a la HAI-P, comparten la Val 86, [presente en el bolsillo 1 (p1)]. Recordemos que la Val 86 (p1) es la única diferencia entre los alelos DRB1*1301 del DRB1*1302. Además de la Val86 , los alelos DRB1*1301 y DRB1*0301 comparten residuos presentes en otros bolsillos de anclaje Estos incluyen a la Ser 13 (compartida por los bolsillo 2 (p2) y 3) , y la Ser 11 del bolsillo 3, a los residuos Asp

28 y Fen 47 del p4 y los aminoácidos Asp 57 y Glu 9 del p5. En este estudio se analizó la susceptibilidad a HAI-P generada por la combinatoria de los aminoácidos presentes en los diferentes bolsillos. Este análisis mostró que la presencia de los aminoácidos Val 86 del bolsillo 1, Ser 11 y Ser 13 (p1, p2 y p3) , se encontraban presentes en 85 % en los pacientes contra el 37 % en los controles (RR = 9,3 y FE = 0,76). A pesar de que la fuerza de asociación es menor a la encontrada con el alelo primario, se obtuvo la fracción etiológica más alta. Stern et al [14] propone que el dimorfismo Gly / Val en la posición 86 modula la especificidad del bolsillo, lo que es evidenciado en otros estudios donde la sustitución de la Gly por la Val favorece la entrada de cadenas laterales aminoacídicas más pequeñas [20, 168]. En un estudio de elución de péptidos de las moléculas DR con los alelos DRB1*1301 y DRB1*1302 mostró que la posición 86 produce diferencias fundamentales en la especificidad de los péptidos presentados. La diferencia principal radica en el residuo de anclaje al bolsillo 1, donde el DRB1*1302 (Gly 86) favorece la entrada de residuos aromáticos como Tyr y Fen mientras que no el DRB1*1301 (Val 86), permitiendo la entrada de residuos alifáticos como Leu y Val [169, 170]. Estos estudios muestran que el DRB1*1301 no favorece el anclaje al bolsillo 1 de residuos aromáticos. Este dimorfismo en la posición 86 , del bolsillo 1, permite explicar que el alelo DRB1*1302 sea capaz de unir péptidos con residuos alifáticos o aromáticos . Dicho de otra manera, el DRB1*1302 puede presentar tanto péptidos aromáticos como alifáticos, mientras que DRB1*1301 solamente alifáticos. Por lo tanto, podemos excluir que la susceptibilidad asociada a la HAI-P se deba a una capacidad de DRB1*1301 de presentar el autoantígeno putativo, carente en el alelo DRB1*1302. Por lo tanto debemos pensar en explicaciones alternativas. Las posibilidades son dos, a) ambos alelos tienen la capacidad de unir el autoantígeno relevante. Sin embargo, la conformación del complejo péptido-DRB1*1302 sería incapaz de activar a los clones T autoreactivos o b) que el alelo DRB1*1302, al ser un mejor presentador del autoantígeno, sea capaz de inducir la delección clonal del clon respectivo en el timo(no el DRB1*1301), generando un estado de tolerancia.

Conclusiones

La población de Buenos Aires presenta una gran diversidad tanto alélica como haplotípica en los loci DRB1, DQA1 y DQB1, así como también una distribución de frecuencias muy particular. Al comienzo de este trabajo el preconcepto decía que la población de Buenos Aires se definía como caucasoide latinoamericana con un gran predominio de influencia Española e Italiana. Nuestros resultados mostraron que la gran migración interna ocurrida en la década del 50 afectó esa composición. Dos métodos diferentes estimaron que el aporte de genes indígenas a nuestra población de la Capital y Gran Buenos Aires sería entre un 10 -13 %.

El estudio de las poblaciones indígenas de wichis y chiriguano mostraron, como era de esperar en una población cerrada, una baja diversidad alélica y haplotípica en los loci DRB1, DQA1 y DQB1. Los alelos hallados fueron los usualmente encontrados en otras poblaciones de aborígenes americanos. Estas dos poblaciones muestran diferencias a nivel alélico y de frecuencias, que la caracterizan a cada una. A pesar de esto, los chiriguano presentan similitudes con los wichis y tobas a nivel de distancias genéticas. La distribución de frecuencias de estos loci en los wichis, se asemeja a otras tribus del mismo grupo lingüístico, los tobas.

En el estudio de la HAI se detectó la susceptibilidad a la enfermedad en pediátricos, con el haplotipo HLA DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603. Además, se determinó que el alelo DRB1*1301 es el que confiere la susceptibilidad y no el DQB1*0603, lo que sugiere que el DRB1 es el locus implicado en la susceptibilidad primaria a la HAIP. El análisis aminoacídico mostró que la combinación de la Val 86, Ser 11 y Ser 13 (p1, p2 y p3) en la cadena DR β podrían ser los residuos involucrados en la presentación del péptido relevante. Por otro lado, debido a que la susceptibilidad no es absoluta, otros genes deben estar asociados a la enfermedad. La HAI en adultos presenta diferencias a nivel genético y en los anticuerpos ASMA y ANA. El alelo DRB1*0405 se lo encontró asociado a la forma adulta, aunque ésta presenta una baja FE. En el subgrupo que padece enfermedades extrahepáticas se confirmó la

asociación con los antígenos DR 4 y HLA A 11. Estos datos proporcionan fuertes evidencias de que la HAI-P y la HAI-AD pueden representar entidades clínicas con diferentes etiopatogenias. Esta hipótesis es avalada también por las diferentes características clínicas encontradas en ambas entidades en el presente trabajo.

Apéndice 1

Genotipos de los individuos estudiados.

Grupos:

Buenos Aires	208 individuos
HAI pediátricos	122 individuos
HAI adultos	84 individuos
Chiriguanos	56 individuos
Wichis	19 individuos

En las siguientes tablas se muestran los genotipos DRB1, DQA1, DQB1 y DRB3 de cada individuo estudiado.

NT alelo no tipificado; Nulo gen no hallado

Individuos de Buenos Aires

Número	Genotipo del locus DRB1		Genotipo del locus DQA1		Genotipo del locus DQB1		Genotipo del locus DRB3	
1-00504	0403	0301	03	05	0302	0301	Nulo	0101
1-00506	0901	0404	03	03	0303	0302	Nulo	Nulo
1-00512	0101	1102	0101	05	0501	0301	Nulo	0202
1-00514	0701	1601	0201	0102	0201	0502	Nulo	Nulo
1-00517	1108	1305	05	05	0301	0301	0202	0202
1-00518	1601	0401	0102	03	0502	0301	Nulo	Nulo
1-00527	0404	1104	03	05	0301	0402	Nulo	Nulo
1-00530	1501	1101	0102	05	0602	0301	Nulo	0202
1-00536	1501	0801	0102	0401	0602	0402	Nulo	Nulo
1-00537	0701	1302	0201	0102	0201	0501	Nulo	0301
1-00540	0901	0405	03	03	0303	0302	Nulo	Nulo
1-00548	1501	1602	0102	05	0602	0301	Nulo	Nulo
1-00550	0901	0403	03	03	0303	0302	Nulo	Nulo
1-00551	1601	0801	0102	0401	0602	0402	Nulo	Nulo
1-00556	1601	1501	0101	0102	0502	0602	Nulo	Nulo
1-00563	1503	0701	0102	0201	0602	0201	Nulo	Nulo
1-00568	0701	1502	0201	0103	0303	0601	Nulo	Nulo

1-00571	0404	1303	03	05	0302	0301	Nulo	0101
1-00573	0701	1101	0201	05	0201	0301	Nulo	0202
1-00575	0701	1101	0201	05	0201	0301	Nulo	0202
1-00576	0301	0411	05	03	0201	0302	0101	Nulo
1-00578	1302	0301	0102	05	0604	0201	0101	0301
1-00585	1301	0301	0103	05	0603	0201	0101	0202
1-00589	1101	1103	05	05	0301	0301	0202	0202
1-00590	0701	1101	0201	05	0303	0301	Nulo	0202
1-00591	1101	0701	05	0201	0301	0201	0202	Nulo
1-00592	1302	0701	0102	0201	0604	0201	0301	Nulo
1-00593	0701	1101	0201	05	0201	0301	Nulo	0202
1-00598	0101	0301	0101	05	0501	0201	Nulo	0101
1-00600	0404	0301	03	05	0302	0201	Nulo	0101
1-00601	0701	1101	0201	05	0201	0301	0202	Nulo
1-00602	1001	0407	0101	03	0501	0302	Nulo	Nulo
1-00604	0101	1402	0101	05	0501	0301	Nulo	0101
1-00606	0101	1103	0101	05	0501	0301	Nulo	0202
1-00608	0101	1101	0101	05	0501	0301	Nulo	0202
1-00614	1601	0801	0102	0401	0502	0402	Nulo	Nulo
1-00615	0101	1303	0101	05	0501	0301	Nulo	0101
1-00616	1601	1303	0101	05	0501	0301	Nulo	0101
1-00620	0901	1501	03	0102	0303	0602	Nulo	Nulo
1-00625	0301	1402	05	05	0201	0301	0101	0101
1-00626	0701	1104	0201	05	0201	0301	Nulo	0202
1-00627	1401	1101	0101	05	0503	0301	0202	0202
1-00630	1601	1402	0102	05	0502	0301	Nulo	0101
1-00634	0403	1501	03	0102	0302	0602	Nulo	Nulo
1-00639	0301	0408	05	03	0201	0301	0101	Nulo
1-00640	0407	1103	03	05	0302	0301	Nulo	0202
1-00641	0301	0408	05	03	0201	0301	0101	Nulo
1-00642	0301	1501	05	0102	0201	0602	0202	Nulo
1-00644	0701	0301	0201	05	0303	0201	Nulo	0202
1-00647	1501	0701	0102	0201	0602	0303	Nulo	Nulo
1-00648	0701	0701	0201	0201	0201	0201	Nulo	Nulo
1-00650	0701	0402	0201	03	0201	0302	Nulo	Nulo
1-00651	1302	0301	0102	05	0604	0201	0301	0101
1-00652	0404	0401	03	03	0301	0302	Nulo	Nulo
1-00653	0701	1301	0201	0103	0201	0603	Nulo	0202
1-00654	0701	0301	0201	05	0201	0201	Nulo	0202
1-00655	1301	0301	0103	05	0603	0201	0101	0202
1-00656	0802	0804	0401	03	0402	0302	Nulo	Nulo
1-00657	0701	1301	0201	0103	0201	0603	Nulo	0101
1-00658	0802	1502	0401	0103	0402	0601	Nulo	Nulo
1-00660	1101	1501	05	0102	0301	0602	0202	Nulo
1-00661	0301	1104	05	05	0201	0301	0202	0202
1-00662	1201	1401	05	0101	0301	0503	0201	0202
1-00663	0701	1101	0201	05	0201	0301	Nulo	0202
1-00664	0103	1104	0101	05	0501	0301	Nulo	0202

1-00665	1302	0301	0102	05	0501	0201	0301	0101
1-00666	0801	0301	0401	05	0402	0201	Nulo	0101
1-00667	1502	1103	0103	05	0601	0301	Nulo	0202
1-00668	1301	0301	0103	05	0603	0201	0101	0101
1-00669	0102	0407	0101	03	0501	0302	Nulo	Nulo
1-00670	1301	0301	0103	05	0603	0201	0101	0101
1-00671	1302	1301	01	0103	0604	0501	0301	0101
1-00675	0701	0807	0201	0401	0201	0402	Nulo	Nulo
1-00676	1401	0301	0101	05	0503	0201	0202	0101
1-00677	1302	1501	0102	0102	0604	0602	0301	Nulo
1-00678	0103	0101	0101	0101	0501	0501	Nulo	Nulo
1-00679	1501	1101	0102	05	0602	0301	Nulo	0202
1-00680	0701	1101	0201	05	0201	0301	Nulo	0202
1-00681	0402	1402	03	05	0302	0301	Nulo	0101
1-00682	0301	1104	05	05	0201	0301	0101	0202
1-00683	0301	0701	05	0201	0201	0303	0101	Nulo
1-00684	0802	1501	0401	0102	0402	0602	Nulo	Nulo
1-00685	0701	1201	0201	05	0303	0301	Nulo	0202
1-00686	1104	1401	05	0101	0301	0503	0202	0202
1-00687	0701	0101	0201	0101	0303	0501	Nulo	Nulo
1-00688	1302	1201	0102	05	0604	0301	0202	0202
1-00689	1602	0701	05	0201	0301	0303	Nulo	Nulo
1-00690	0701	0402	0201	03	0201	0302	Nulo	Nulo
1-00691	0301	0807	05	0401	0201	0402	0202	Nulo
1-00692	1301	1301	0103	0103	0603	0603	0101	0101
1-00693	0413	1501	03	0101	0302	0602	Nulo	Nulo
1-00694	1301	1402	0103	05	0603	0301	0101	0101
1-00696	1302	1301	0102	0103	0604	0603	0101	0301
1-00697	0401	0408	03	03	0301	0302	Nulo	Nulo
1-00698	0301	1501	05	0101	0201	0602	0101	Nulo
1-00699	1502	0807	0103	0401	0602	0402	Nulo	Nulo
1-00700	0401	0901	03	03	0302	0303	Nulo	Nulo
1-00703	1101	1302	05	0102	0301	0604	0301	0201
1-00705	1001	0103	0101	0101	0501	0501	Nulo	Nulo
1-00706	1605	1101	0102	05	0502	0301	Nulo	0202
1-00707	0103	0101	0101	0101	0501	0501	Nulo	Nulo
1-00709	0101	1104	0101	05	0501	0301	Nulo	0202
1-00711	1101	1101	05	05	0301	0301	0202	0202
1-00712	0301	0301	05	05	0201	0201	0202	0101
1-00713	0701	0701	0201	0201	0201	0201	Nulo	Nulo
1-00714	0407	1601	03	0102	0302	0502	Nulo	Nulo
1-00716	1101	1402	05	05	0301	0301	0101	0202
1-00718	0301	1601	05	0102	0201	0502	0202	Nulo
1-00719	1501	1601	0102	0102	0602	0502	Nulo	Nulo
1-00721	0301	0701	05	0201	0201	0303	0101	Nulo
1-00725	0301	1401	05	0101	0201	0503	0202	Nulo
1-00726	0403	0101	03	0101	0301	0501	Nulo	Nulo
1-00727	1503	1406	0102	05	0602	0301	Nulo	0101

1-00728	0804	1501	05	0102	0301	0602	Nulo	Nulo
1-00729	0901	1406	03	05	0303	0301	Nulo	0101
1-00731	1101	1601	05	0102	0301	0502	0202	Nulo
1-00732	0101	1501	0101	0102	0501	0602	Nulo	Nulo
1-00733	0807	0802	0401	03	0402	0302	Nulo	Nulo
1-00734	1301	0401	0103	03	0603	0301	0101	Nulo
1-00735	0401	1601	03	0102	0301	0502	Nulo	Nulo
1-00736	1104	0409	05	03	0301	0201	0202	Nulo
1-00737	0301	0401	05	03	0201	0301	0202	Nulo
1-00738	1302	0803	0102	0401	0604	0402	0301	Nulo
1-00739	0701	0301	0201	05	0201	0201	Nulo	0101
1-00740	0701	0301	0201	05	0303	0201	Nulo	0101
1-00741	0401	0701	03	0201	0301	0201	Nulo	Nulo
1-00742	0701	0701	0201	0201	0201	0201	Nulo	Nulo
1-00743	0101	0402	0101	03	0501	0302	Nulo	Nulo
1-00744	0301	1601	05	0102	0201	0502	0202	Nulo
1-00745	0804	1001	0401	0101	0402	0501	Nulo	Nulo
1-00746	0101	1501	0101	0102	0501	0602	Nulo	Nulo
1-00747	0101	0801	0101	0401	0501	0402	Nulo	Nulo
1-00749	0701	1401	0201	0101	0201	0503	Nulo	0202
1-00750	0101	1301	0101	0103	0501	0603	Nulo	0202
1-00751	0404	1501	03	0102	0302	0602	Nulo	Nulo
1-00752	0701	0804	0201	0401	0201	0402	Nulo	Nulo
1-00753	0101	1302	0101	0102	0501	0604	Nulo	0301
1-00754	0701	0404	0201	03	0201	0302	Nulo	Nulo
1-00755	1301	0802	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
1-00756	0901	0802	03	0401	0303	0402	Nulo	Nulo
1-00757	0301	0401	05	03	0201	0301	0202	Nulo
1-00758	0701	0802	0201	0401	0201	0402	Nulo	Nulo
1-00759	0101	0802	0101	03	0501	0302	Nulo	Nulo
1-00760	0402	0407	03	03	0302	0301	Nulo	Nulo
1-00761	0301	0701	05	0201	0201	0201	0101	Nulo
1-00762	0407	0408	03	03	0302	0303	Nulo	Nulo
1-00763	0701	1501	0201	0102	0201	0602	Nulo	Nulo
1-00765	0803	1601	05	0102	0301	0502	Nulo	Nulo
1-00766	1401	1501	0102	0101	0602	0503	0202	Nulo
1-00767	0409	0807	03	0401	0302	0402	Nulo	Nulo
1-00768	0802	1503	03	0102	0302	0602	Nulo	Nulo
1-00769	1102	1301	0103	05	0603	0301	0202	0202
1-00770	0701	1115	0201	05	0201	0301	Nulo	0202
1-00771	0701	1501	0201	0102	0201	0602	Nulo	Nulo
1-00775	0407	1501	03	0102	0301	0602	Nulo	Nulo
1-00776	0101	1501	0101	0102	0501	0602	Nulo	Nulo
1-00777	0301	1501	05	0102	0201	0602	0101	Nulo
1-00780	0410	1104	03	03	0301	0302	0202	Nulo
1-00781	0102	16	0101	0102	0501	0502	Nulo	Nulo
1-00783	0802	1307	0401	05	0402	0301	Nulo	0101
1-00784	1501	0802	0102	03	0602	0302	Nulo	Nulo

1-00785	0301	0407	05	03	0301	0303	0101	Nulo
1-00786	0402	1303	03	05	0302	0301	Nulo	Nulo
1-00788	0101	1101	0101	05	0501	0301	Nulo	0202
1-00789	1302	0801	0103	0401	0603	0402	0202	Nulo
1-00790	0401	0701	03	0201	0303	0302	Nulo	Nulo
1-00791	0402	1302	03	0102	0302	0604	Nulo	0301
1-00793	0701	0102	0201	0101	0303	0501	Nulo	Nulo
1-00794	1502	1102	0101	0102	0602	0602	Nulo	0202
1-00797	0101	0401	0101	03	0501	0301	Nulo	Nulo
1-00798	1301	1302	0103	0102	0603	0604	0101	0101
1-00799	1302	0102	0102	0101	0604	0501	0202	Nulo
1-00800	0403	0411	03	03	0302	0303	Nulo	Nulo
1-00801	0701	1302	0201	0102	0201	0604	Nulo	0301
1-00802	1301	1501	0103	0102	0603	0602	0202	Nulo
1-00803	0301	1104	05	05	0201	0301	0202	0202
1-00804	0701	1302	0201	0102	0201	0604	Nulo	0301
1-00805	0901	1101	03	05	0303	0301	Nulo	0202
1-00806	0701	0103	0201	0101	0201	0501	Nulo	Nulo
1-00807	1401	1106	0101	05	0503	0301	0202	0202
1-00808	1503	1302	0102	0102	0602	0604	Nulo	0301
1-00809	0301	1101	05	05	0201	0301	0101	0202
1-00810	0701	1302	0201	0102	0201	0604	Nulo	0301
1-00811	1001	1301	0101	0103	0501	0603	Nulo	0101
1-00812	0806	1501	03	0102	0402	0602	Nulo	Nulo
1-00813	1104	0808	05	03	0301	0302	0202	Nulo
1-00814	0701	0701	0201	0201	0201	0303	Nulo	Nulo
1-00815	1601	1301	0102	0103	0502	0603	Nulo	0101
1-00816	0701	1201	0201	05	0201	0301	Nulo	0202
1-00817	0301	1401	05	0101	0201	0503	0101	0202
1-00818	0801	1404	0401	0101	0402	0503	Nulo	0202
1-00819	1101	1402	05	05	0301	0301	0202	0101
1-00820	1502	1305	05	0103	0301	0601	Nulo	0202
1-00821	1501	0701	0102	0201	0602	0201	Nulo	Nulo
1-00822	0403	1001	03	0101	0402	0501	Nulo	Nulo
1-00824	0301	1101	05	03	0201	0301	0202	0202
1-00825	0301	1301	05	0103	0201	0603	NT	NT
1-00826	0102	1302	NT	NT	NT	NT	NT	NT
1-00827	0701	1301	0201	0103	0201	0603	NT	NT
1-00828	0101	0301	0101	05	0501	0201	NT	NT
1-00829	0401	1502	03	0103	0302	0601	NT	NT
1-00830	0405	1302	03	0102	0302	0604	NT	NT
1-00831	1602	1101	NT	NT	NT	NT	NT	NT
1-00832	0102	1104	0101	03	0603	0501	NT	NT
1-00833	0301	0301	05	05	0201	0201	NT	NT
1-00834	0101	0701	0101	0201	0501	0201	NT	NT
1-00835	0701	1301	0201	0103	0201	0603	NT	NT
1-00836	1301	1302	0103	0102	0603	0604	NT	NT

Pacientes pediátricos con HAI

Número	Genotipo del locus DRB1		Genotipo del locus DQA1		Genotipo del locus DQB1		Genotipo del locus DRB3	
3-00001	1301	0301	0103	0103	0603	0201	0101	0101
3-00002	1301	0407	0103	03	0603	0302	0202	Nulo
3-00003	0301	0301	05	05	0201	0201	0101	0101
3-00004	1402	1501	05	0102	0301	0602	0101	Nulo
3-00005	1301	1501	0103	0102	0603	0602	0101	Nulo
3-00006	1301	0301	03	05	0603	0201	0101	0101
3-00007	0101	1102	0101	05	0501	0301	Nulo	0202
3-00008	1301	0301	0103	03	0603	0201	0101	0101
3-00009	1501	0301	0102	05	0602	0201	Nulo	0101
3-00010	1301	0404	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
3-00011	0701	0408	0201	03	0201	0302	Nulo	Nulo
3-00012	0301	0301	05	05	0201	0201	0101	0101
3-00013	0901	1301	03	0103	0303	0603	Nulo	0202
3-00015	1301	0801	NT	NT	0603	0402	NT	NT
3-00016	1301	0801	0103	0401	0603	0402	0101	Nulo
3-00017	1301	0701	NT	NT	0301	0201	0202	Nulo
3-00018	1501	1501	0102	03	0602	0602	Nulo	Nulo
3-00019	1301	0404	0103	03	0603	0302	0201	Nulo
3-00020	1301	0402	0103	03	0603	0201	0101	Nulo
3-00022	1301	0405	0103	03	0603	0402	0201	Nulo
3-00023	1301	0404	NT	NT	0603	0402	0201	Nulo
3-00024	1301	0804	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
3-00026	1301	1101	0103	0102	0603	0602	0202	0202
3-00027	0301	0404	05	03	0201	0302	0202	Nulo
3-00028	1501	0403	0102	03	0602	0302	Nulo	Nulo
3-00029	0701	0301	0103	03	0201	0201	Nulo	0101
3-00030	1301	0301	0103	05	0603	0201	0101	0101
3-00032	1301	0901	0103	03	0603	0303	0201	Nulo
3-00033	1301	0102	0103	0101	0603	0501	0101	Nulo
3-00034	1502	0411	0103	03	0601	0302	Nulo	Nulo
3-00035	0101	1104	0101	05	0501	0301	Nulo	0202
3-00036	0901	1301	NT	NT	0303	0603	Nulo	0202
3-00037	1301	1501	0103	0102	0603	0602	0101	Nulo
3-00038	0701	0301	0201	05	0201	0201	Nulo	0202
3-00039	0417	1301	03	0103	0302	0603	Nulo	0101
3-00040	1301	1502	0103	0103	0603	0601	0101	Nulo
3-00041	1301	0406	0103	03	0603	0402	0201	Nulo
3-00042	1301	0301	0103	05	0603	0201	0202	0101
3-00043	1301	0301	0103	05	0603	0201	0101	0101

3-00045	0301	1301	05	0103	0201	0603	0101	0202
3-00047	1301	0301	0103	05	0603	0201	0202	0101
3-00048	0301	0101	NT	NT	0201	0501	0202	Nulo
3-00049	1301	0102	0103	0101	0603	0501	0202	Nulo
3-00050	1301	0701	0103	0201	0603	0201	0101	Nulo
3-00051	1301	0404	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
3-00053	04	04	NT	NT	0302	0302	Nulo	Nulo
3-00054	1301	0101	0103	0101	0603	0501	0101	Nulo
3-00055	0701	1602	0201	05	0201	0301	Nulo	Nulo
3-00056	1301	0407	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
3-00057	04	08	NT	NT	0402	0302	Nulo	Nulo
3-00058	0101	0301	0101	05	0501	0201	0101	Nulo
3-00059	1301	0301	0103	05	0603	0201	0101	0101
3-00060	0701	0101	0201	0101	0201	0501	Nulo	Nulo
3-00061	1301	0301	03	0501	0301	0201	Nulo	Nulo
3-00062	1301	0407	0103	03	0603	0301	0101	Nulo
3-00063	1104	1301	03	0103	0302	0603	0202	0202
3-00064	1301	1101	0103	05	0603	0301	0101	0202
3-00065	1301	0101	03	0101	0303	0501	0202	Nulo
3-00066	1301	0411	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
3-00067	1402	0301	05	05	0301	0201	0101	0101
3-00068	1301	0901	0103	0201	0603	0303	0202	Nulo
3-00069	1301	0802	0103	0401	0603	0402	0101	Nulo
3-00070	1301	0701	0103	0201	0603	0201	0101	Nulo
3-00071	0301	1501	05	0102	0201	0602	0101	Nulo
3-00072	1301	0802	0103	03	0603	0402	0101	Nulo
3-00073	1301	0407	NT	NT	0603	0201	0202	Nulo
3-00074	1301	1402	05	0103	0603	0301	0101	0202
3-00075	1301	0407	0102	03	0503	0302	0101	Nulo
3-00076	1301	0301	0102	05	0603	0201	0101	0202
3-00077	1301	0102	0103	0101	0603	0501	0101	Nulo
3-00078	1302	0701	NT	NT	0604	0201	Nulo	Nulo
3-00079	1301	0411	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
3-00080	1301	0701	0102	03	0603	0201	0101	Nulo
3-00081	1301	1104	0103	05	0603	0301	0101	0202
3-00082	1301	1402	0103	05	0603	0301	0101	0101
3-00083	0301	1501	05	03	0201	0602	0202	Nulo
3-00084	1301	0403	0103	03	0603	0302	0202	Nulo
3-00085	1301	1402	0103	05	0603	0301	0101	0101
3-00086	1301	0411	0103	03	0603	0302	0202	0202
3-00088	1301	1501	0103	0102	0603	0602	0101	Nulo
3-00089	1301	1402	0103	05	0603	0301	0101	0101
3-00090	1301	0301	0103	05	0603	0201	0101	0202
3-00092	0802	1402	NT	NT	0402	0301	Nulo	0101
3-00093	0101	0103	0101	0101	0501	0501	Nulo	Nulo
3-00094	1301	0407	03	0103	0302	0603	0101	Nulo
3-00095	1301	1501	0103	0102	0602	0603	0101	Nulo
3-00096	0301	0101	05	0101	0201	0501	0202	Nulo

3-00097	1301	0411	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
3-00098	1301	0411	0103	03	0603	0402	0101	Nulo
3-00099	1301	1101	0103	0102	0603	0602	0101	0202
3-00100	0301	1401	05	0101	0201	0501	0101	0201
3-00102	0802	0407	03	03	0302	0302	Nulo	Nulo
3-00104	0102	0405	NT	NT	NT	NT	Nulo	Nulo
3-00105	0701	1301	0201	0103	0201	0603	Nulo	0202
3-00106	0411	1301	03	0103	0302	0603	Nulo	0101
3-00108	0301	1301	05	0103	0201	0603	0101	0202
3-00110	0301	0802	05	05	0201	0301	0202	Nulo
3-00112	0901	1601	03	0102	0303	0502	Nulo	Nulo
3-00114	0701	1401	0201	0101	0201	0503	Nulo	0202
3-00118	0301	0802	05	03	0201	0302	0202	Nulo
3-00119	0701	1406	0201	05	0201	0301	Nulo	0101
3-00121	0101	0101	0101	0101	0501	0501	Nulo	Nulo
3-00127	1301	1101	0103	05	0603	0301	0202	0202
3-00133	1301	0404	0103	03	0603	0302	0202	Nulo
3-00134	1301	0411	0103	03	0603	0302	0101	Nulo
3-00136	0901	1301	03	03	0303	0302	Nulo	0101
3-00139	0403	1301	03	0103	0302	0603	NT	NT
3-00140	1501	1301	0102	0103	0602	0603	NT	NT
3-00143	1501	1102	0102	05	0602	0301	NT	NT
3-00150	04	04	NT	NT	NT	NT	NT	NT
3-00158	1301	1402	0103	05	0603	0301	NT	NT
3-00159	0301	1401	05	0101	0201	0503	NT	NT
3-00160	1501	0301	0102	05	0602	0201	NT	NT
3-00161	0401	1301	03	0103	0301	0603	NT	NT
3-00162	1501	1301	0102	0103	0602	0603	NT	NT
3-00163	0403	1301	03	0103	0304	0604	NT	NT
3-00164	0403	1301	03	0103	0302	0501	NT	NT
3-00165	1301	1303	0103	05	0603	0301	NT	NT
3-00166	0411	1401	03	0101	NT	NT	NT	NT
3-00167	0701	1301	NT	NT	0201	0603	NT	NT

Pacientes adultos con HAI

Número	Genotipo del locus DRB1		Genotipo del locus DQA1		Genotipo del locus DQB1		Genotipo del locus DRB3	
4-00001	0405	1301	03	0103	0302	0603	Nulo	0101
4-00002	0403	0301	03	05	0302	0201	Nulo	0101
4-00005	0405	1302	03	0102	0604	0302	Nulo	0301
4-00006	0404	0301	03	05	0302	0201	Nulo	0101
4-00007	0405	0102	03	0101	0302	0501	Nulo	Nulo
4-00008	1301	1101	0103	05	0603	0301	0101	0202
4-00009	1302	0301	0102	05	0604	0201	0301	0202
4-00010	0405	1501	03	0102	0302	0602	Nulo	Nulo
4-00012	0301	0901	0401	03	0402	0201	Nulo	0101
4-00013	0405	0103	03	0101	0302	0501	Nulo	Nulo
4-00015	0402	0402	03	03	0302	0201	Nulo	Nulo
4-00016	1001	1301	0101	0103	0501	0603	Nulo	0101
4-00017	04	1501	NT	NT	0302	0602	Nulo	Nulo
4-00018	1301	1501	0103	0102	0603	0602	0202	Nulo
4-00023	0401	1301	03	0103	0302	0603	Nulo	0101
4-00024	0402	1301	03	0103	0301	0603	Nulo	0202
4-00025	0301	1301	NT	NT	0201	0603	Nulo	Nulo
4-00029	0301	1301	NT	NT	0201	0603	Nulo	Nulo
4-00032	1402	1601	05	0102	0301	0502	0101	Nulo
4-00033	0404	0101	03	0101	0302	0501	Nulo	Nulo
4-00034	0701	0701	0201	0201	0201	0201	Nulo	Nulo
4-00035	0403	1603	03	0102	0302	0502	Nulo	Nulo
4-00036	1402	1501	NT	NT	0503	0602	Nulo	Nulo
4-00058	0402	1501	NT	NT	NT	NT	Nulo	Nulo
4-00060	1501	1501	0102	0102	0602	0602	Nulo	Nulo
4-00061	0701	1302	0201	0102	0201	0604	Nulo	0301
4-00062	1104	1401	05	0101	0503	0503	0202	0202
4-00063	0701	1302	0201	0102	0201	0604	Nulo	0301
4-00064	0407	1302	03	0102	NT	NT	Nulo	Nulo
4-00066	1501	1502	0102	0103	0602	0601	Nulo	Nulo
4-00067	1501	0301	0102	05	0602	0201	Nulo	0202
4-00068	11	03	05	05	0301	0201	0202	0202
4-00069	1603	1301	0102	0103	0502	0603	Nulo	0202
4-00071	0301	1301	05	0103	0201	0603	0101	0101
4-00072	1601	0802	0103	03	0502	0302	Nulo	Nulo
4-00073	0403	0802	03	0401	0302	0402	Nulo	Nulo
4-00074	1201	1502	05	0103	0301	0601	0202	Nulo
4-00075	1603	NT	05	0102	0301	0602	Nulo	Nulo
4-00076	0301	1501	05	0102	0201	0602	0101	Nulo
4-00077	0404	1502	03	0103	0302	0601	Nulo	Nulo

4-00078	11	0301	0101	05	0503	0201	0202	0101
4-00079	1401	1501	0101	0102	0503	0602	0201	Nulo
4-00080	1502	0102	0102	0101	0601	0501	Nulo	Nulo
4-00082	1101	1101	05	05	0301	0301	Nulo	Nulo
4-00083	0401	0102	03	0101	0501	0302	Nulo	Nulo
4-00084	0801	0101	0401	0101	0402	0501	Nulo	Nulo
4-00085	0802	0301	0401	05	0201	0402	Nulo	Nulo
4-00087	1301	0701	0103	0201	0603	0201	Nulo	Nulo
4-00088	03	1001	05	0101	0201	0501	Nulo	Nulo
4-00089	0701	0102	0201	0101	0303	0501	Nulo	Nulo
4-00091	0301	1301	05	0103	0201	0603	0202	0202
4-00092	1304	0802	05	0401	0301	0402	0202	Nulo
4-00097	1301	0801	0103	0401	0603	0402	0101	Nulo
4-00098	0402	1303	03	05	0302	0301	Nulo	0101
4-00101	0701	0301	05	0201	0201	0201	Nulo	0101
4-00102	0101	0301	0101	05	0501	0201	Nulo	0202
4-00103	0301	0807	05	0401	0201	0402	0202	Nulo
4-00104	0404	1102	03	05	0302	0301	Nulo	0202
4-00105	0701	0301	0201	05	0201	0201	Nulo	Nulo
4-00106	1104	0301	05	05	0301	0201	0202	0101
4-00107	1501	1301	0101	0103	0602	0603	Nulo	0101
4-00108	0801	1301	0401	0103	0402	0603	Nulo	0202
4-00109	1101	1601	0102	05	NT	NT	Nulo	Nulo
4-00110	0405	1401	03	0101	0201	0503	Nulo	Nulo
4-00111	1001	1401	0101	0101	0501	0503	Nulo	0201
4-00112	0807	1302	0401	0102	0402	0604	Nulo	0301
4-00113	0401	1101	05	05	0301	0302	Nulo	0202
4-00114	0802	1104	03	05	0302	0301	Nulo	0202
4-00115	1501	1104	0102	05	0602	0301	Nulo	0202
4-00116	0301	1301	05	0101	0201	0501	0202	0301
4-00117	0404	0701	NT	NT	0302	0201	Nulo	Nulo
4-00118	1401	1301	0101	0103	0503	0603	0101	0202
4-00120	0101	0802	0401	0401	0502	0402	Nulo	Nulo
4-00121	0301	1001	05	0101	0201	0501	0202	Nulo
4-00122	0405	1201	03	05	0301	0201	Nulo	0202
4-00123	0401	0801	03	0401	0301	0301	Nulo	Nulo
4-00124	0407	0701	03	0201	0302	0201	Nulo	Nulo
4-00125	0102	0301	0101	05	0501	0201	Nulo	Nulo
4-00126	0403	1102	03	05	0302	0301	Nulo	0202
4-00128	08	03	0401	05	0201	0402	NT	NT
4-00129	0401	1301	03	0103	0302	0603	NT	NT
4-00130	0405	1602	03	0102	0502	0302	NT	NT
4-00131	0301	0405	05	03	0302	0201	NT	NT
4-00132	0701	1303	0201	05	0301	0201	NT	NT
4-00133	0102	1501	0101	0102	0501	0602	NT	NT
4-00134	1301	1402	0103	05	0603	0301	NT	NT

Indios chiriguanos

Número	Genotipo del locus DRB1		Genotipo del locus DQA1		Genotipo del locus DQB1	
5-00020	0804	1402	0401	05	0402	0301
5-00021	0802	1602	0401	05	0402	0301
5-00022	0802	1402	0401	05	0301	0402
5-00023	1602	1402	05	05	0301	0301
5-00024	0407	1402	03	03	0301	0302
5-00025	1602	0407	03	03	0301	0302
5-00026	0404	1406	03	05	0301	0302
5-00027	0804	1201	0401	0101	0402	05
5-00028	1402	1402	05	05	0301	0301
5-00029	0411	1402	03	05	0301	0302
5-00030	1402	0407	05	03	0301	0302
5-00031	0701	1402	0201	05	0201	0301
5-00032	1406	1402	05	05	0301	0301
5-00033	1406	0407	05	03	0301	0302
5-00034	1201	0407	05	03	0301	0302
5-00035	0802	1402	0401	05	0402	0301
5-00036	0802	1602	0401	05	0402	0301
5-00037	1201	1406	0101	05	05	0301
5-00038	1402	0401	05	03	0301	0301
5-00039	1406	1406	05	05	0301	0301
5-00040	0802	0802	0401	05	0402	0402
5-00041	1406	1406	05	05	0301	0301
5-00042	1602	1502	0102	05	0602	0301
5-00043	1602	1402	05	05	0301	0301
5-00044	1602	1406	05	05	0301	0301
5-00045	1406	0411	05	03	0301	0302
5-00046	0101	0802	0101	0401	05	0402
5-00047	1602	1406	05	05	0301	0301
5-00048	1602	1406	05	05	0301	0301
5-00049	1602	0407	05	03	0301	0302
5-00050	0807	1501	0401	0102	0402	0602
5-00051	0901	1402	03	05	0301	0303
5-00052	0802	1406	0401	05	0402	0301
5-00053	1406	1406	05	05	0301	0301
5-00054	1602	1402	05	05	0301	0301
5-00055	1602	0802	05	0401	0301	0402
5-00056	1602	1502	05	05	0301	0301
5-00057	1602	1201	0101	05	05	0301
5-00058	0411	0411	03	03	0302	0302
5-00059	1602	1602	05	05	0301	0301
5-00060	0403	1402	03	05	0302	0301
5-00061	1402	1402	05	05	0301	0301

5-00062	1402	1406	05	05	0301	0301
5-00063	1406	0802	05	0401	0301	0402
5-00064	0804	1406	0401	05	0402	0301
5-00065	0411	1406	03	05	0302	0301
5-00066	1602	1402	05	05	0301	0301
5-00067	1602	1201	0101	05	05	0301
5-00068	0802	0901	0401	03	0402	0303
5-00069	1602	1302	05	0102	0301	0604
5-00070	0701	1406	0201	05	0201	0301
5-00071	1402	0802	05	0401	0301	0402
5-00072	1402	1406	05	05	0301	0301
5-00073	0403	1406	03	05	0302	0302
5-00074	1402	1402	05	05	0301	0302
5-00075	1602	1604	05	03	NT	NT

Indios wichis

Número	Genotipo del locus DRB1	Genotipo del locus DQA1	Genotipo del locus DQB1			
11-00001	0411	0417	03	03	0302	0302
11-00002	0404	1402	05	03	0301	0302
11-00003	0701	0802	0201	0401	0201	0402
11-00004	0411	1402	03	05	0302	0301
11-00005	0411	0802	03	0401	0302	0402
11-00006	0417	0411	03	05	0302	0302
11-00007	0411	1402	03	03	0302	0301
11-00008	0901	1406	03	05	0303	0301
11-00009	0404	0417	03	03	0302	0302
11-00010	0404	1101	05	03	0302	0301
11-00011	0411	1406	05	03	0302	0301
11-00012	0301	14	05	05	0301	0301
11-00013	1406	1406	05	05	0301	0301
11-00014	0901	14	03	05	0301	0301
11-00015	1402	1402	05	05	0301	0301
11-00016	0404	1402	03	05	0302	0301
11-00017	0802	1409	0401	05	0402	0301
11-00018	0411	0802	03	0401	0302	0402
11-00019	0411	0804	03	0401	0302	0402

Acrónimos y Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ANA	<i>Antinuclear antibodies</i>
ASGP-R	<i>Asialo glycoprotein receptor</i>
ASMA	<i>Anti smooth muscle antibodies</i>
CD	Cluster de diferenciación
CDR	<i>Complementarity determining regions</i>
CIITA	<i>Class II transactivator</i>
CPA	<i>Célula presentadora de antígenos</i>
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>
EM	<i>Expectation-maximization</i>
FE	<i>Fracción etiológica</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony- stimulating factor</i>
HA	Hemoaglutinina
HAI	Hepatitis Autoinmune
HAI-AD	<i>Hepatitis Autoinmune adulta</i>
HAI-P	<i>Hepatitis Autoinmune pediátrica</i>
HAV	<i>Hepatitis A virus</i>
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HCA	<i>Hepatitis crónica activa</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IDDM	<i>Insulin-dependent diabetes mellitus</i>
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IRE	<i>Interferon responder element</i>

LE	<i>Lupus eritematoso</i>
LKM	<i>Liver kidney microsomes</i>
LT	Linfocito T
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
ma	<i>millones de años</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MLE	<i>Maximum likelihood estimates</i>
N-J	<i>Neighbor joining</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NOD	<i>Non obese diabetic</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i>
RCLB	<i>Red cell lysis buffer</i>
RR	<i>Riesgo relativo</i>
SLA	<i>Soluble liver antigen</i>
SSOP	<i>Sequence Specific oligonucleotide probe</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T _H	<i>T helper</i>
TMAC	<i>Tetramethylammonium chloride</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group method with arithmetic mean</i>
WCLB	<i>White cell lysis buffer</i>

Bibliografia

1. Zinkernagel, R. and P. Doherty, *The discovery of MHC restriction*. Immunology Today, 1997. **18**.
2. Bjorkman, P.J., *et al.*, *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. Nature, 1987. **329**(6139): p. 506-12.
3. Madden, D.R., *et al.*, *The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC*. Cell, 1992. **70**(6): p. 1035-48.
4. Garboczi, D.N., *et al.*, *Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2 [comment]*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 134-41.
5. Smith, K.J., *et al.*, *An altered position of the alpha 2 helix of MHC class I is revealed by the crystal structure of HLA-B*3501*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 203-13.
6. Bodmer, J.G., *et al.*, *Nomenclature for factors of the HLA system, 1996*. Vox Sang, 1997. **73**(2): p. 105-30.
7. Parham, P., E. Adams, and K. Arnett, *The origins of the HLA-A,B,C polymorphism*. Imm. Rev., 1995. **143**: p. 141-179.
8. Madden, D.R., *et al.*, *The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation*. Nature, 1991. **353**(6342): p. 321-5.
9. Guo, H., *et al.*, *Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle*. Nature, 1992. **360**: p. 364-366.
10. Giles, R.C. and J.D. Capra, *Structure, function, and genetics of human class II molecules*. Adv Immunol, 1985. **37**: p. 1-71.
11. Brown, J.H., *et al.*, *Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [see comments]*. Nature, 1993. **364**(6432): p. 33-9.

12. Kaufman, J.F., *et al.*, *The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex*. Cell, 1984. **36**(1): p. 1-13.
13. Marrack, P. and J. Kappler, *The antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptor on T cells*. Adv Immunol, 1986. **38**: p. 1-30.
14. Stern, L.J., *et al.*, *Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide*. Nature, 1994. **368**(6468): p. 215-21.
15. Dessen, A., *et al.*, *X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 473-81.
16. Pareja, E., *et al.*, *The tetramer model: a new view of class II MHC molecules in antigenic presentation to T cells*. Tissue Antigens, 1997. **50**: p. 421-428.
17. Jorgensen, J., *et al.*, Nature, 1992. **355**: p. 224-230.
18. Garcia, K., *et al.*, *An alpha-beta Tcell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex*. Science, 1996. **274**: p. 209-219.
19. Kreiger, J. and e. al., J. Immun., 1991. **146**: p. 2331-2340.
20. Newton-Nash, D. and D. Eckels, *Differential effect of polymorphism at HLA-DR1 beta-chain position 85 and 86 on binding and recognition of DR 1-restricted antigen peptides*. J. Immun., 1993. **150**: p. 1813-1821.
21. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Imm. Today, 199.
22. Strachan, T., *et al.*, *Complete nucleotide sequence of a functional class I HLA gene, HLA-A3: implications for the evolution of HLA genes*. Embo J, 1984. **3**(4): p. 887-94.
23. Ways, J.P., H.L. Coppin, and P. Parham, *The complete primary structure of HLA-Bw58*. J Biol Chem, 1985. **260**(22): p. 11924-33.
24. Sodoyer, R., *et al.*, *Complete nucleotid sequence of a gene encoding a functional human class I histocmopatibility antigen (HLA-Cw3)*. EMBO J., 1984. **3**: p. 879-885.

25. Larhammar, D., *et al.*, *Characterization of an HLA DRbeta pseudogene*. PNAS, 1985. **82**: p. 1475-1479.
26. Larhammar, D., *et al.*, *Complete amino acid sequence of an HLA-DR antigen-like beta chain as predicted from the nucleotide sequence: Similarities with immunoglobulins and HLA-A, -B, and -C antigens*. PNAS, 1982. **79**: p. 3687-3691.
27. Das, H.K., S.K. Lawrance, and S.M. Weissman, *Structure and nucleotide sequence of the heavy chain gene of HLA-DR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3543-7.
28. Janosy, G., *et al.*, *Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte macrophage immunoregulation*. Lancet, 1981. **II**: p. 839-843.
29. Fuggel, F., *et al.*, *Localization of major histocompatibility complex (HLA-ABC and DR) antigens in 46 kidneys*. Transplantation, 1983. **35**: p. 385-390.
30. Daar, A., *et al.*, *The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs*. Transplantation, 1984. **38**: p. 293-298.
31. Brami, C., *et al.*, *HLA-DR antigens on human trophoblast*. Am. J. Reprod. Immunol., 1983. **3**: p. 165-174.
32. Defrance, T., *et al.*, *Interleukin 13 is a B cell stimulating factor*. J. Exp. Med., 1994. **179**: p. 135-43.
33. Burnstein, H., *et al.*, *Humoral immune functions in IL-4 transgenic mice*. J. Immunol., 1991. **147**: p. 2950-56.
34. Go, N., *et al.*, *Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cell*. J. Exp. Med., 1990. **172**: p. 1625-31.
35. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by GM-CSF plus IL-4 and downregulated by TNF alfa*. J. Exp. Med., 1994. **179**: p. 1109-18.
36. Glimcher, L. and C. Lara, *Sequences and factors: a guide to MHC-Class II transcription*. Annu. Rev. Immunol., 1992. **10**: p. 13-49.

37. Steimle, V., *et al.*, *Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome)*. *Cell*, 1993. **75**: p. 135-146.
38. Steimle, V., *et al.*, *A novel DNA binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome)*. *Genes. Dev.*, 1995. **9**: p. 1021-32.
39. Mach, B., *et al.*, *Regulation of MHC class II genes: Lessons from a disease*. *Annu. Rev. Immunol.*, 1996. **14**: p. 301-31.
40. Bonnerot, C., *et al.*, *Roll of B cell receptor Ig alfa and Ig beta subunit in MHC class II restricted antigen presentation*. *Immunity*, 1995. **3**: p. 335-47.
41. Mellman, I. and H. Plutner, *I nternalization and degradation of macrophage Fc receptor bound to polyvalent immune complexes*. *J. cell Biol.*, 1984. **129**: p. 1170-77.
42. Busch, R., *et al.*, *In variant chain protect class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum*. *EMBO J.*, 1996. **15**: p. 418-28.
43. Riese, R., *et al.*, *Essential role for cathepsin S in MHC class II associated invariant chain processin and peptide loading*. *immunity*, 1996. **4**: p. 357-66.
44. Creswell, P., *Invariant chain structure and MHC class II function*. *Cell*, 1996. **84**: p. 505-7.
45. Figueroa, F., *et al.*, *Class II Mhc genes in rodent evolution*. *Imm. Rev.*, 1990. **113**: p. 27-46.
46. Bontrop, R.E., *et al.*, *RFLP analysis of the HLA-, ChLA-, and RhLA-DQ alpha chain gene regions: conservation of restriction sites during evolution*. *Immunogenetics*, 1989. **30**(6): p. 432-9.
47. Hughes, A.L. and M. Nei, *Evolutionary relationships of class II major-histocompatibility-complex genes in mammals*. *Mol Biol Evol*, 1990. **7**(6): p. 491-514.

48. Gustafsson, K., *et al.*, *Class II genes of the human major histocompatibility complex. Evolution of the DP region as deduced from nucleotide sequences of the four genes.* J Biol Chem, 1987. **262**(18): p. 8778-86.
49. Andersson, G., *et al.*, *Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DR beta genes [published erratum appears in J Biol Chem 1988 Jun 15;263(17):8551].* J Biol Chem, 1987. **262**(18): p. 8748-58.
50. Satta, Y., W.E. Mayer, and J. Klein, *HLA-DRB intron 1 sequences: implications for the evolution of HLA-DRB genes and haplotypes.* Hum Immunol, 1996. **51**(1): p. 1-12.
51. Satta, Y., W.E. Mayer, and J. Klein, *Evolutionary relationship of HLA-DRB genes inferred from intron sequences.* J Mol Evol, 1996. **42**(6): p. 648-57.
52. Klein, J., *Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis.* Hum Immunol, 1987. **19**(3): p. 155-62.
53. Wu, S.K., T.L. Saunders, and F.H. Bach, *Polymorphism of Human Ia antigens generated by reciprocal intergenic exchange between two DR B loci.* Nature, 1986. **324**: p. 676-679.
54. Begovich, A. and *e. al.*, *Polimorphism, recombination, and linkage disequilibrium with the Class II region.* J. Immunol., 1992. **148**: p. 249-258.
55. Hughes, A. and M. Nei, *Nucleotid substitution at Major Histocompatibility Complex Class II loci: evidence for overdominance selection.* PNAS, 1989. **86**: p. 958-962.
56. Gorski, J. and B. Mach, *Polymorfism of human Ia antigens: gene conversion between two DRB loci results in a new HLA-D/DR specificity.* Nature, 1986. **322**: p. 67-72.
57. Gyllensten, U.B., M. Sundvall, and H.A. Erlich, *Allelic diversity is generated by intraexon sequence exchange at the DRB1 locus of primates.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3686-90.

58. Mayer, W.E., *et al.*, *Trans-species origin of Mhc-DRB polymorphism in the chimpanzee*. Immunogenetics, 1992. **37**(1): p. 12-23.
59. Bergstrom, T.F., *et al.*, *Recent origin of HLA-DRB1 alleles and implications for human evolution [see comments]*. Nat Genet, 1998. **18**(3): p. 237-42.
60. Tiwari, J. and P. Terasaki, *HLA and disease associations*. 1985: Springer-Verlag. v-vii.
61. Lilly, F. and T. Pincus, *Genetic control of murine viral leukemogenesis*. Adv. Cancer Res., 1973. **17**: p. 231.
62. Sholsstein, L., *et al.*, *High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis*. N. Engl. J. Med., 1973. **288**: p. 704-706.
63. Svejgaard, A. and L. Ryder, *Association between HLA and disease*, ed. S.A. Dausset J. 1977: Munksgaard, Copenhagen.
64. Zhao, Z., *et al.*, *Molecular mimicry by Herpes Simplex Virus-Type 1: Autoimmune disease after viral infection*. Science, 1998. **279**: p. 1344-1347.
65. Todd, J., J. Bell, and H. McDevitt, *HLA-DQB gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-independent diabetes mellitus*. Nature, 1987. **329**: p. 599-604.
66. Thorsby, E., *Invited anniversary review: HLA associated diseases*. Hum Immunol, 1997. **53**(1): p. 1-11.
67. Barnett, A., *et al.*, *Diabetes in identical twins*. Diabetologia, 1981. **20**: p. 87.
68. Undlien, D.E., *et al.*, *HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection*. Diabetes, 1997. **46**(1): p. 143-9.
69. Capps, R., *Clinical aspects of sequelae of acute hepatitis*. Gastroenterology, 1948. **11**: p. 680-684.
70. Waldenstrom, J. *Leber, Blutprotein und Nahrungseiweiss*. in *Dtsch Ges.* 1950.

71. Kunkel, H. and D. Labby, *Chronic liver disease following infectious hepatitis*. in *Cirrhosis of the liver*. 1950: Ann. Intern. Med.
72. Zimmerman, H., P. Heller, and R. Hill, *Extreme hyperglobulinemia in subacute hepatic necrosis*. N. Engl. J. Med., 1951. **244**: p. 245-249.
73. Mackay, I., L. Taft, and D. Cowling, *Lupoid hepatitis*. Lancet, 1956. **2**: p. 1323-1326.
74. Joske, R. and W. King, *The "LE cell" phenomenon in active chronic viral hepatitis*. Lancet, 1955. **2**: p. 477-480.
75. Holborow, E., *et al.*, *Antinuclear factor and other antibodies in blood and liver disease*. Br. Med. J., 1963. **1**: p. 656-658.
76. Johnson, G., E. Holborow, and L. Glyn, *Antibody to smooth muscle in patients with liver disease*. Lancet, 1965. **2**: p. 878-879.
77. Toh, B.H., *Smooth muscle autoantibodies and autoantigens*. Clin Exp Immunol, 1979. **38**(3): p. 621-8.
78. Homberg, J.C., *et al.*, *Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis*. Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1333-9.
79. Popper, H., F. Pronetto, and F. Schaffner, *Immune processes in the pathogenesis of liver disease*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965. **124**: p. 781-799.
80. Czaja, A.J., *Natural history, clinical features, and treatment of autoimmune hepatitis*. Semin Liver Dis, 1984. **4**(1): p. 1-12.
81. Czaja, A.J., *et al.*, *Autoimmune features as determinants of prognosis in steroid-treated chronic active hepatitis of uncertain etiology*. Gastroenterology, 1983. **85**(3): p. 713-7.
82. Mackay, I.R., *Immunological aspects of chronic active hepatitis*. Hepatology, 1983. **3**(5): p. 724-8.
83. McFarlane, B.M., *et al.*, *Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders*. J Hepatol, 1986. **3**(2): p. 196-205.

84. *Autoimmune Hepatitis*, ed. Mikio Nishioka, Gotaro Toda, and Z. Mikio. 1994, Amsterdam: Elsevier Science B.V.
85. Czaja, A.J., *Auto-immune chronic active hepatitis: a specific entity? The negative argument [see comments]*. *J Gastroenterol Hepatol*, 1990. **5**(3): p. 343-51.
86. McFarlane, I.G., *et al.*, *Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result? [see comments]*. *Lancet*, 1990. **335**(8692): p. 754-7.
87. Kenny, R., *et al.*, *Frequency and significance of antimitochondrial antibodies in severe chronic active hepatitis*. *Dig. Dis. Sci.*, 1986. **31**: p. 705-711.
88. Johnson, P.J. and I.G. McFarlane, *Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group*. *Hepatology*, 1993. **18**(4): p. 998-1005
Consulte #1 & #2.
89. Keating, J.J., *et al.*, *Influence of aetiology, clinical and histological features on survival in chronic active hepatitis: an analysis of 204 patients*. *Q J Med*, 1987. **62**(237): p. 59-66.
90. Sanchez-Urdazpal, L., *et al.*, *Prognostic features and role of liver transplantation in severe corticosteroid-treated autoimmune chronic active hepatitis*. *Hepatology*, 1992. **15**(2): p. 215-21.
91. Mackay, I.R. and P. Morris, *Association of autoimmune chronic hepatitis with HL-A1*, 8. *Lancet*, 1972. **ii**: p. 793-795.
92. Morris, P.J., *et al.*, *Histocompatibility antigens (HLA): associations with immunopathic diseases and with responses to microbial antigens*. *Aust N Z J Med*, 1977. **7**(6): p. 616-24.
93. Freudenberg, J., *et al.*, *HLA in different forms of chronic active hepatitis. A comparison between adult patients and children*. *Digestion*, 1977. **15**(4): p. 260-70.
94. Opelz, G.V., AJM. Summerskills, WHJ. Schalm, SW. Terasaki, PI., *HLA determinants in chronic active liver disease: possible relation of HLA-DW3 to prognosis*. *Tissue Antigens*, 1977. **9**: p. 36-40.

95. *Joint Report-Active Chronic Hepatitis. in Histocompatibility Testing 1977.* 1977. Munksgaard, Copenhagen.
96. Mackay, I.R. and B.D. Tait, *HLA associations with autoimmune-type chronic active hepatitis: identification of B8-DRw3 haplotype by family studies.* *Gastroenterology*, 1980. **79**(1): p. 95-8.
97. Tait, B., *et al.* *DNA typing: DPA and DPB analysis. in Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop.* 1991. Yokohama.
98. Tait, B., *et al.*, *HLA A1, B8, DR3 extended haplotypes in autoimmune chronic hepatitis.* *Gastroenterology*, 1989. **97**(2): p. 479-81.
99. Czaja, A.J., *et al.*, *Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis.* *Gastroenterology*, 1993. **105**(5): p. 1502-7.
100. Donaldson, P.T., *et al.*, *Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors.* *Hepatology*, 1991. **13**(4): p. 701-6.
101. Krawitt, E.L., *et al.*, *Immunogenetic studies of autoimmune chronic active hepatitis: HLA, immunoglobulin allotypes and autoantibodies.* *Hepatology*, 1987. **7**(6): p. 1305-10.
102. Seki, T., *et al.*, *Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients.* *Hepatology*, 1990. **12**(6): p. 1300-4.
103. Miyamori, H., *et al.*, *HLA antigens in Japanese patients with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis.* *Digestion*, 1983. **26**(4): p. 213-7.
104. Doherty, D.G., *et al.*, *Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis.* *Hepatology*, 1994. **19**(3): p. 609-15.
105. Strettell, M.D., *et al.*, *Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis.* *Gastroenterology*, 1997. **112**(6): p. 2028-35.
106. Seki, T., *et al.*, *HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients.* *Gastroenterology*, 1992. **103**(3): p. 1041-7.

107. Ota, M., *et al.*, *A possible association between basic amino acids of position 13 of DRB1 chains and autoimmune hepatitis*. Immunogenetics, 1992. **36**(1): p. 49-55.
108. Marcos, Y., *et al.*, *Two-locus involvement in the association of human leukocyte antigen with the extrahepatic manifestations of autoimmune chronic active hepatitis*. Hepatology, 1994. **19**(6): p. 1371-4 Consulte #1 & #2.
109. Fainboim, L., *et al.*, *Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1*1301) haplotype*. Hum Immunol, 1994. **41**(2): p. 146-50 Consulte #1.
110. Scully, L.J., *et al.*, *Early-onset autoimmune hepatitis is associated with a C4A gene deletion*. Gastroenterology, 1993. **104**(5): p. 1478-84.
111. Vergani, D., *et al.*, *Genetically determined low C4: a predisposing factor to autoimmune chronic active hepatitis*. Lancet, 1985. **2**(8450): p. 294-8.
112. Doherty, D.G., *et al.*, *Polymorphism in the human complement C4 genes and genetic susceptibility to autoimmune hepatitis*. Autoimmunity, 1994. **18**(4): p. 243-9.
113. Schiff, E.R., *Atypical clinical manifestations of hepatitis A*. Vaccine, 1992. **10 Suppl 1**: p. S18-20.
114. Vento, S., *et al.*, *Identification of hepatitis A virus as a trigger for autoimmune chronic hepatitis type 1 in susceptible individuals*. Lancet, 1991. **337**(8751): p. 1183-7.
115. Huppertz, H.I., *et al.*, *Autoimmune hepatitis following hepatitis A virus infection*. J Hepatol, 1995. **23**(2): p. 204-8.
116. Rahaman, S.M., P. Chira, and R.S. Koff, *Idiopathic autoimmune chronic hepatitis triggered by hepatitis A*. Am J Gastroenterol, 1994. **89**(1): p. 106-8 Consulte #1 & #2.
117. *Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference*. in *HLA*. 1992. Yokohama, Japan: Oxford University Press.

118. *Genetic diversity of HLA Functional and Medical implication.* in *HLA*. 1997. Paris, France: Medical and Science International Publisher.
119. Krausa, P., *et al.*, *HLA-A locus alleles identified by sequence specific PCR.* Lancet, 1993. **341**: p. 121-122.
120. Ceppellini, B., M. Siniscalco, and C. Smith, *The estimation of gene frequencies in a random-mating population.* Ann. Human Genet., 1955. **20**: p. 97-115.
121. Weir, B., *Genetic Data Analysis.* 1990, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
122. Excoffier, L. and M. Slatkin, *Maximum-Likelihood Estimation of Molecular Haplotype Frequencies in a Diploid Population.* Mol. Biol. Evol., 1995. **12**(5): p. 921-927.
123. Slatkin, M. and L. Excoffier, *Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm.* Heredity, 1996. **76**: p. 377-383.
124. Schneider, S., *ARLEQUIN: a software package for population genetics.*, . 1996, Lab, Dept. Of Anthropology, University of Geneva.
125. Lewontin, R., *On measures of gametic disequilibrium.* Genetics, 1988. **120**: p. 849-852.
126. Lewontin, R., *The interaction of selection and linkage. I. General considerations; Heterotic models.* Genetics, 1964. **49**: p. 46-67.
127. Guo, S. and E. Thomson, *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.* Biometrics, 1992. **48**: p. 316-372.
128. Cavalli-Sforza, L.L. and A.W.F. Edwards, *Phylogenetic analysis: models and estimation procedures.* Evolution, 1967. **32**: p. 550-570.
129. Felsenstein, J., *Phylogeny Inference Package,* 1995: University of Washington.
130. Cavalli-Sforza, L.L., P. Menozzi, and A. Piazza, *The History and Geography of Human Genes,* ed. P.U. Press. 1994, Princeton, New Jersey.

131. Bengtsson, B.O. and G. Thompson, *Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases*. *Tissue Antigens*, 1981. **18**: p. 356-363.
132. Svejgaard, A. and L. Ryder, *HLA and disease associations: Detecting the strongest association*. *Tissue Antigens*, 1994. **43**: p. 18-27.
133. Cerna, M., M. Falco, and e. al, *Differences in HLA Class II Alleles of isolated South American Indian populations from Brazil and Argentina*. *Human Immunol.*, 1993. **37**: p. 213-220.
134. Terasaki, P., D. Gjertson, and e. al, *HLA 1997*, ed. U.T.T. Laboratory. 1997, Los Angeles, California.
135. Olivo, A., *et al.*, *Mexican Lacandon Indians of Mayan Ancestry Normal*, , P. Terazaki, Editor. 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory.
136. Fernandez-Viña, M., J. Moraes, and e. al, *HLA Class II haplotypes in Amerindians and in black North and South Americans*. *Tissue Antigens*, 1991. **38**: p. 235.
137. Just, J.J., *et al.*, *African-American HLA class II allele and haplotype diversity [corrected and republished article originally printed in Tissue Antigens 1996 Dec;48(6):636-44]*. *Tissue Antigens*, 1997. **49**(5): p. 547-55.
138. Ferencik, S. and H. Grosse-Wilde, *Caucasian German Normal*, in *HLA 1997*, U.T.T. Laboratory, Editor. 1997: Los Angeles, California. p. 222.
139. Fukunishi, T. and M. Hashimoto, *Japanese Normal*, in *HLA 1997*, P. Terazaki, Editor. 1997, UCLA Tissue Typing Laboratory: Los Angeles, California. p. 269.
140. Mizuki, N., *et al.*, *Major Histocompatibility complex class II alleles in an Uygur population in the Silk Route of Northwest China*. *Tissue Antigens*, 1998. **51**: p. 287-292.
141. Ivanova, R., E. Naoumova, and e. al, *HLA-DRB1, DQA1, DQB1 DNAPolymorphism in the Bulgarian population*. *Tissue Antigens*, 1996. **47**: p. 122-126.

142. Djoulah, S., *et al.*, *HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 DNA polymorphism in healthy Algerians and genetic relationships with other populations*. *Tissue Antigens*, 1994. **43**: p. 102-109.
143. *IV Censo General de la Nación*, ed. M.d.A.T. PRESIDENCIA DE LA NACION. Vol. I. 1947, Buenos Aires, Argentina: Dirección Nacional del Servicio de Estadística.
144. *TERCER CENSO NACIONAL 1914*, ed. P.D.L. NACION. Vol. II. 1916, Buenos Aires, ARGENTINA: Dirección Nacional del Servicio Estadístico.
145. Dunand, V.A., *et al.*, *HLA-DR 52- and 51-associated DRB1 alleles in Kenya, east Africa*. *Tissue Antigens*, 1997. **49**(4): p. 397-402.
146. Chang, Y.W. and B.R. Hawkins, *HLA class I and class II frequencies of a Hong Kong Chinese population based on bone marrow donor registry data*. *Hum Immunol*, 1997. **56**(1-2): p. 125-35.
147. Chandanayingyong, D., *et al.*, *HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1, and -DQB1 polymorphism in Thais*. *Hum Immunol*, 1997. **53**(2): p. 174-82.
148. Fischer, G., *et al.*, *An HLA-DR11 variant (HLA-DRB1*1115) segregating in a family of Turkish origin*. *Tissue Antigens*, 1995. **45**(2): p. 143-144.
149. Bettinotti, M. and e. al, *DRB1*1605: a new DR2-DRB1 allele found in a German family*. *Immunogen.*, 1994. **39**: p. 300.
150. Nei, m. and A. Hughes. *Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci*. in *HLA*. 1992. Yokohama, Japan: Oxford University Press.
151. Amoroso, A. and e. al. *AHS#17: HLA-DR8*. in *HLA*. 1997. Paris, France: Medical and Science International Publisher.
152. Ginther, C., *et al.*, *Genetic variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes*. *Exs*, 1993. **67**: p. 211-9.
153. Bonatto, S.L. and F.M. Salzano, *A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1866-71.

154. Bortolini, M.C., *et al.*, *Genetic variability in two Brazilian ethnic groups: a comparison of mitochondrial and protein data*. *Am J Phys Anthropol*, 1997. **103**(2): p. 147-56.
155. Heidrich, E.M., *et al.*, *DIS80 locus variability in three Brazilian ethnic groups*. *Hum Biol*, 1995. **67**(2): p. 311-9.
156. Hutz, M.H., *et al.*, *DIS80 locus variability in South American Indians*. *Ann Hum Biol*, 1997. **24**(3): p. 249-55.
157. Rodriguez-Delfin, L., S.E. Santos, and M.A. Zago, *Diversity of the human Y chromosome of South American Amerindians: a comparison with blacks, whites, and Japanese from Brazil*. *Ann Hum Genet*, 1997. **61**(Pt 5): p. 439-48.
158. Petzl-Erler, M., R. Luz, and V. Sotomaior, *The HLA polymorphism of two distinctive South- American Indian tribes: The Kaingang and the Guarani*. *Tissue Antigens*, 1993. **41**: p. 227-237.
159. Guedez, Y. and e. al, *Molecular analysis of MHC class II alleles and haplotypes (DRB1, DQA1 and DQB1) in the Bari Amerindians*. *Tissue Antigens*, 1994. **44**: p. 125-128.
160. Petzl-Erler, M. and H. McDevitt, *Molecular analysis of the HLA-DRB genes in two tribes of Brazilian Indians*. *Human Immunol.*, 1994. **41**: p. 180-184.
161. Blagitko, N., *et al.*, *Polymorphism of the HLA-DRB1 locus in Colombian, Ecuadorian, and Chilean Amerinds*. *Hum Immunol*, 1997. **54**(1): p. 74-81.
162. Zhang, S., M. Fernandez-Viña, and e. al, *A novel HLA-DRB1 allele (DRB1*0417) in South American Indians*. *Immunogen.*, 1993. **38**: p. 463.
163. Monsalve, M., G. Edin, and D. Devine, *Analysis of HLA Class I and Class II in Na-Dene and Amerindian Populations from British Columbia, Canada*. *Human Immunol.*, 1998. **59**: p. 48-55.
164. Sala, A., G. Penacino, and D. Corach, *Comparison of allele frequencies of eight STR loci from Argentinian Amerindian and European populations*. *Hum Biol*, 1998. **70**(5): p. 937-47.

165. Fainboim, L., *et al.* *HLA and Autoimmune Hepatitis In: "HLA: Genetic Diversity of of HLA Functional and Medical Implication.* 1997.
166. Gonzalez, J., *et al.*, *Infeccion por Virus de Hepatitis A (HAV) en niños en Argentina, ensayo piloto.* Acta Gastroent. Latinamer., 1997. 27: p. 331-334.
167. Vallbracht, A., *et al.*, *Cell-mediated cytotoxicity in hepatitis A virus infection.* Hepatology, 1986. 6: p. 1308-14.
168. Busch, R., *et al.*, *Effect of natural polymorphism at residue 86 of the HLA-DR beta chain on peptide binding.* J Immunol, 1991. 147(4): p. 1292-8.
169. Davenport, M., *et al.*, *Analysis of peptide-binding motif for two disease associated HLA-DR 13 alleles using an M 13 phage display library.* Immunology, 1996. 88: p. 482-486.
170. Davenport, M., *et al.*, *Naturally processed peptides from two disease-resistance-associated HLA-DR 13 alleles show related sequence motifs and the effects of the dimorphism at position 86 of the HLA-DRbeta chain.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1995. 92: p. 6567-6571.