



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y HAPLOTÍPICAS DEL  
SISTEMA HLA EN RECEPTORES Y DONADORES EN PROTOCOLO DE  
TRASPLANTE RENAL Y EN PROTOCOLO DE DONADOR FALLECIDO DE LA  
UMAE HE CMN SXXI DEL SERVICIO DE TRASPLANTES Y NEFROLOGÍA DE

2005 A 2011

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ANDREA ORTEGA YÁÑEZ



MÉXICO, DF.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Enrique Ortega Soto

VOCAL: Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría

SECRETARIO: Profesor: Julio César Martínez Álvarez

1er SUPLENTE: Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño

2° SUPLENTE: Profesor: Gibrán Pérez Montesinos

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Histocompatibilidad.

Banco Central de Sangre. CMN SXXI. IMSS.

ASESOR DEL TEMA:

---

E.B.C. Julio César Martínez Álvarez.

SUSTENTANTE:

---

Andrea Ortega Yáñez.

## *AGRADECIMIENTOS*

En primer lugar, gracias a Dios, por todo lo que me ha concedido. Gracias por tu amor incondicional, por las innumerables bendiciones con las que me has colmado hasta ahora, por nunca desampararme en el camino y por siempre superar lo que yo pudiera esperar o desear. En particular, gracias por disponer todo para la realización de este trabajo. Gracias por demostrarme que “quien a Dios tiene nada le falta, sólo Dios basta”.

A mamita María, Señora del Cielo y Madre de Dios, por ser también mi guía y madre, mi ejemplo de mujer, plena y digna, mi modelo de obediencia, pureza, humildad y caridad.

A mi mamá, por todo tu amor y apoyo a lo largo de mi vida, por siempre confiar en mí, por tu paciencia y sabiduría, por estar para mí siempre, en fin, ¡gracias por todo, mamá! ¡Te quiero mucho! ¡Eres la mejor! ¡Ah! Y gracias también por ser la ¡mejor Q.F.B. del mundo! e inspirarme para ser como tú, con este trabajo, estoy más cerca de lograrlo.

A mi mamá Lole y mi papá Ciri, por todo su amor y cariño, por su fe, su paciencia, por estar conmigo en todo momento, por sus consejos, y por todo lo que me han dado para ser ahora la persona que soy.

Al padre Miguel Blázquez Avís, c.m. por todas sus enseñanzas y palabras de aliento, por ser mi guía espiritual en los años más difíciles de mi vida, por su amistad y por ser gran ejemplo de cristiano, santo y apóstol.

Al Q.F.B. Rodrigo Barquera Lozano, por tu trascendental contribución en la realización del presente trabajo, sabes que esto no hubiera sido posible sin tu ayuda. Gracias por todo lo que me enseñaste, por tu calidad humana y profesional, por tu enorme paciencia, comprensión y por tu amistad.

A Lucio, por ser no solo mi mejor amigo, sino un hermano de verdad, por vivir conmigo tantas experiencias, que atesoro en mi corazón. Por escucharme siempre, a pesar de la distancia, por las risas y ocurrencias, por apoyarme en mis locuras y formar parte de ellas y por tu apoyo también en los momentos más tortuosos de mi vida. ¡Te quiero mucho!

A José, gracias por ser siempre tú y por ser parte de mi vida, por todo tu cariño, ayuda, paciencia, sinceridad y confianza, en resumen, por ser increíble conmigo, por todo lo que hemos vivido y por todo lo que nos falta por vivir. En verdad, no sabes lo importante que te has vuelto para mí, ありがとうございます!!。愛していますよ!!

Al Lic. Arturo Torres “Cuchu”, por tu amistad, locuras y por toda tu importantísima ayuda y paciencia durante la creación de las figuras de esta tesis. ¡Muchas gracias, baby!

A mis tios Vick, León, Sofy y Moy y mi prima Manfer por todas las lecciones de vida que me han dado. A toda la familia García, por su apoyo. Y a Borrelia y Mr. Folín<sup>†</sup>.

A todos mis amigos que me han acompañado a lo largo de los años, y a todas las personas que de alguna u otra forma han influido en mi vida. ¡Gracias a todos!

A Jorge A. Gómez Valdés por su importante y valiosísima ayuda para la realización de esta tesis.

A la Dra. Perla y a la QFB Lupita, por todo su apoyo a lo largo de mi estancia en la Facultad, por recibirme en su cubículo en muchas ocasiones, tanto buenas como malas, siempre con las palabras de consuelo y la ayuda que necesitaba, con una sonrisa sincera y amable, junto con los ánimos para continuar en esta exigente carrera.

A los monaguillos y a Juventudes Marianas, por su amistad, por haber crecido juntos en edad y conocimientos, pero también en fe y en Gracia de Dios. Al grupo de Jornadas por ser instrumentos bellísimos de Dios y ayudarme a cambiar mi visión de la vida. Gracias a los padres de la Congregación de la Misión: Manuel, Ángel Arroyo, Mario, Pepe, Rubén Darío e Ismael por sus enseñanzas y consejos, por contribuir en mi formación y brindarme su amistad.

Y finalmente, gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme una formación académica de excelencia y sentar los cimientos de mi carrera profesional.

Sólo me resta agregar que este trabajo va dedicado para ti, Señor, como primicia de todas las cosas que aún me faltan por vivir y hacer. También dedico esta tesis a mis papás, mi familia y amigos y a todas las personas que sufren alguna enfermedad y que podrán ser ayudadas gracias a las aportaciones de este trabajo y todos los trabajos que surjan a partir de éste.

***DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y HAPLOTÍPICAS DEL SISTEMA  
HLA EN RECEPTORES Y DONADORES EN PROTOCOLO DE TRASPLANTE RENAL  
Y EN PROTOCOLO DE DONADOR FALLECIDO DE LA UMAE HE CMN SXXI DEL  
SERVICIO DE TRASPLANTES Y NEFROLOGÍA DE 2005 A 2011.***

**CONTENIDO**

---

Índice de tablas .....	4
Índice de figuras .....	5
Abreviaturas .....	6
1. Resumen .....	8
2. Introducción .....	10
3. Antecedentes.....	12
3.1. Generalidades históricas del descubrimiento del MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad).....	12
3.1.1. Descripción del sistema HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos).14	
3.2. Organización genómica del HLA.....	17
3.2.1. Polimorfismo y surgimiento de nuevos alelos.....	21
3.2.2. Desequilibrios de ligamiento.....	22
3.3. Nomenclatura.....	25
3.4. Expresión y estructura de las moléculas del MHC .....	29
3.5. Trasplantes y el sistema HLA.....	36
3.6. Enfermedades asociadas a HLA.....	37
3.7. Estudio poblacional de frecuencias alélicas y haplotípicas. ....	39
3.7.1. Descripción de frecuencias alélicas y haplotípicas .....	39
3.7.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	41
3.8. Estudios de frecuencias alélicas y haplotípicas en México y su relación con otros grupos poblacionales .....	43
3.8.1. Panorama general del surgimiento de la diversidad genética en México. ....	43

3.8.2. Situación demográfica actual de la población del valle de México	45
4. Planteamiento del problema y Justificación.....	47
5. Objetivo.....	49
5.1. Objetivos particulares.....	49
6. Hipótesis.....	50
7. Diseño Metodológico .....	51
7.1. Muestra .....	51
7.2. Tipificación del sistema HLA en el laboratorio de Histocompatibilidad	52
7.2.1. Obtención de la muestra de DNA.....	52
7.2.2. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando Oligonucleótidos de Secuencia Específica (PCR-SSOP) .....	53
7.2.3. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando Primers de Secuencia Específica (PCR-SSP) .....	54
7.3. Parámetros estadísticos.....	55
7.3.1. Estimación de frecuencias alélicas y haplotípicas de los genes HLA-A, -B, -DRB1 y -DQB1.....	56
7.3.2. Estudio del LD y Delta' ( $\Delta'$ ).....	57
7.3.3. Estadístico t .....	57
7.3.4. Cálculo del HWE.....	58
8. Resultados.....	59
9. Discusión .....	68
9.1. Diversidad .....	68
9.2. Haplotipos .....	70
9.3. Desequilibrios de ligamiento .....	71
9.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	74
10. Conclusiones .....	76
11. Perspectivas .....	77
12. Referencias.....	81
13. Anexos.....	103
13.1. Extracción de DNA con Kit comercial (Roche®).....	103
13.2. Procedimiento para realizar la técnica PCR-SSO.....	104

13.3.	Procedimiento para realizar la técnica PCR-SSP .....	105
13.4.	Electroforesis en gel de agarosa.....	108

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1: Frecuencias de los grupos de alelos de los genes <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> , <i>-DRB1</i> y <i>-DQB1</i> en la muestra analizada del Valle de México.....	59
Tabla 2: Haplotipos más frecuentes de la población del Valle de México. ....	61
Tabla 3 Desequilibrios más frecuentes entre los alelos <i>HLA-A</i> y <i>-B</i> en la población mestiza del Valle de México. ....	62
Tabla 4 Desequilibrios más frecuentes entre los alelos <i>HLA-B</i> y <i>-DRB1</i> en la población mestiza del Valle de México.....	64
Tabla 5 Desequilibrios más frecuentes entre los alelos <i>HLA-DRB1</i> y <i>-DQB1</i> en la población mestiza del Valle de México.....	65
Tabla 6. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Mapa génico del Complejo Principal de Histocompatibilidad humano (MHC).....	20
Figura 2. Herencia mendeliana de los haplotipos de HLA demostrada en estudios familiares.....	23
Figura 3. Ejemplo de nomenclatura en el sistema HLA.....	27
Figura 4. Ejemplo de célula que expresa las moléculas de clase I y II.....	30
Figura 5. Molécula de HLA clase I.....	32
Figura 6. Molécula de HLA clase II.....	33
Figura 7. Procesamiento antigénico y presentación de antígenos endógenos por el MHC clase I y clase II.....	35

## ABREVIATURAS

---

ACD	Ácido Cítrico Dextrosa
APC	Células Presentadoras de Antígeno ( <i>Antigen-Presenting Cell</i> )
$\beta_2m$	$\beta_2$ -microglobulina
BCS UMAE-HE del CMN SXXI	Banco Central de Sangre de la Unidad Médica de Alta Especialidad-Hospital de Especialidades, del Centro Médico Nacional SXXI
BMDW	Donadores Mundiales de Médula Ósea ( <i>Bone Marrow Donors Worldwide</i> )
CEHs	Haplotipos Extendidos Conservados ( <i>Conserved Extended Haplotypes</i> )
cM	Centimorgan
CONAPO	Consejo Nacional de Población
$\Delta'$	Valor de LD estandarizado
DIP	Polimorfismos de Delección/Inserción ( <i>Deletion/Insertion Polymorphisms</i> )
DNA	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
EICH	Enfermedad Injerto contra Hospedero
F.a.	Frecuencia alélica
F.h.	Frecuencia haplotípica
Genes Ir	Genes de Respuesta Inmune
H-2	locus de histocompatibilidad 2
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos ( <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
HSC	Células Madre Hematopoyéticas ( <i>Hematopoietic Stem Cells</i> )
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg ( <i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> )
li	Cadena Invariante ( <i>Invariant Chain</i> )
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía

kDa	kiloDalton
KIR	Receptores tipo Inmunoglobulina de las Células NK ( <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor</i> )
LD	Desequilibrio de ligamiento ( <i>Linkage Disequilibrium</i> )
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
NK	Células <i>Natural Killer</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PRA	Panel Reactivo de Anticuerpos ( <i>Panel Reactive Antibodies</i> )
RE	Retículo Endoplásmico
RR	Riesgo Relativo
SBT	Tipificación basada en secuenciación ( <i>Sequencing Based Typing</i> )
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SNP	Polimorfismos de un Solo Nucleótido ( <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> )
SSOP/SSO	Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica ( <i>Sequence Specific Oligonucleotide Probe</i> )
SSP	Primers de Secuencia Específica ( <i>Single Specific Primer</i> )
t	Estadístico t
TAP	Transportador asociado con el Procesamiento del Antígeno ( <i>Transporter associated with Antigen Processing</i> )
TCR	Receptor de Linfocito T ( <i>T Cell Receptor</i> ).
TNF	Factores de Necrosis Tumoral
WHO	Organización Mundial de la Salud ( <i>World Health Organization</i> )
xMHC	MHC extendido
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México

## 1. RESUMEN

---

En seres humanos, uno de los principales componentes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es el sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA), el cual se considera que es la región más polimórfica en el genoma humano. Con más de 100 genes con funciones inmunológicas, esta región genómica se ha estudiado por muchos años con notables avances en la inmunología clínica. El sistema HLA es reconocido por su importancia en trasplantes y sus asociaciones con enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, así como en estudios de diversidad en poblaciones. En la presente tesis se analizaron los alelos HLA de clase I y II en una muestra de 1994 pacientes, tanto receptores como donadores en protocolo de trasplante renal y receptores en protocolo de donador fallecido pertenecientes a la Zona Metropolitana de Valle de México (ZMVM), de los cuales se obtuvieron los correspondientes haplotipos *HLA-A/-B/-DRB1/-DQB1*. Las tipificaciones se realizaron por el método de PCR-SSOP y PCR-SSP.

A partir de los análisis realizados, se obtuvo que no existe diferencia significativa entre receptores y donadores dentro de la muestra estudiada. Para ambos grupos, se determinaron las frecuencias alélicas y haplotípicas del sistema HLA. Producto de ello, se encontraron casi en su totalidad todos los grupos alélicos del sistema HLA, lo que manifiesta la gran diversidad alélica presentada por nuestra población; entre los alelos que con mayor frecuencia se encontraron se cuentan los siguientes: *HLA-A: A\*02, A\*24, A\*68, A\*31 y A\*01; HLA-B: B\*35, B\*39, B\*40:02, B\*15:01 y B\*51; HLA-DRB1: DRB1\*04, DRB1\*08, DRB1\*14, DRB1\*13 y DRB1\*01*, finalmente para *HLA-DQB1: DQB1\*03:02, DQB1\*03:01 y DQB1\*04*. Por su parte, los haplotipos obtenidos con mayor frecuencia reflejan a la ancestría nativa americana como predominante en nuestra población, lo cual concuerda con otros estudios realizados en esta misma, los haplotipos más frecuentemente encontrados fueron: *HLA-A\*02/-B\*39/-DRB1\*04/-DQB1\*03:02; HLA-A\*02/-B\*35/-*

*DRB1\*08/-DQB1\*04; HLA-A\*68/-B\*39/-DRB1\*04/-DQB1\*03:02; HLA-A\*02/-B\*35/-DRB1\*04/-DQB1\*03:02; HLA-A\*24/-B\*39/-DRB1\*04/-DQB1\*03:02.* Se estudió el desequilibrio de ligamiento (LD) de los loci *HLA-A/-B*, *HLA-B/-DRB1* y *HLA-DRB1/-DQB1*, lo cual mostró fuertes asociaciones entre *HLA-A\*01/-B\*08; HLA-A\*29/-B\*44; HLA-A\*02/-B\*52; HLA-A\*02/-B\*51; HLA-A\*02/-B\*15:01; HLA-B\*14:02/-DRB1\*01; HLA-B\*08/-DRB1\*03:01; HLA-B\*07/-DRB1\*15; HLA-B\*18/-DRB1\*03:01* y *HLA-B\*44/-DRB1\*07*; en cuanto a las asociaciones *HLA-DRB1/-DQB1* todas presentaron valores significativos para LD, destacando *HLA-DRB1\*10/-DQB1\*05; HLA-DRB1\*04/-DQB1\*03:02; HLA-DRB1\*01/-DQB1\*05; HLA-DRB1\*03:01/-DQB1\*02* y *HLA-DRB1\*08/-DQB1\*04*. En base a las asociaciones entre pares de alelos y los haplotipos encontrados, se determinó la ancestría y el origen poblacional de los mismos, en función del origen histórico y la composición demográfica de nuestra población a lo largo del tiempo. Finalmente se encontró que en los genes de HLA clase I, el equilibrio de Hardy-Weinberg no se cumple.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son de gran relevancia para futuros estudios genéticos en los diversos grupos poblacionales del país, en particular por su aplicación en los protocolos de trasplante así como por su asociación a enfermedades y su futura aplicación en áreas como la farmacogenética; todo esto con el fin de explotar el potencial del sistema HLA y sus implicaciones, más allá de su función como moléculas presentadoras de antígenos.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

La tarea de presentar antígenos para que sean reconocidos por los linfocitos T, corre a cargo de proteínas especializadas, expresadas en la superficie celular y que son codificadas por genes presentes en el *locus* denominado Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex, MHC*).

En el ser humano, el MHC es conocido como sistema HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) por que estos antígenos fueron inicialmente identificados y caracterizados usando aloanticuerpos contra leucocitos. Anticuerpos Leucocito-aglutinantes (leucoaglutininas) fueron observados en el suero de mujeres multíparas y pacientes previamente transfundidos. Se encontró que el rechazo a los injertos estaba asociada al desarrollo de anticuerpos contra leucocitos alogénicos. Concluyéndose así que las diferencias en los alelos del HLA entre personas, son determinantes importantes del rechazo de injertos de un individuo a otro. Se han identificado a la fecha, diversos locus genéticos polimórficos y que codifican para los antígenos expresados en los leucocitos humanos.

Las frecuencias de alelos HLA y sus patrones de desequilibrio de ligamiento varían entre diferentes poblaciones humanas, por lo cual el estudio del polimorfismo HLA ha sido relevante en estudios de genética antropológica, en la diferenciación interpoblaciones e intrapoblaciones, lo que permite definir grupos étnicos específicos, mezclas raciales, distancias genéticas y patrones de migración.

De igual manera, la caracterización del polimorfismo de estas moléculas en una determinada población es una poderosa herramienta en la práctica clínica para la realización de estudios de asociación HLA con diversas enfermedades y en el caso de trasplantes de órganos, particularmente trasplantes renales, permite calcular la probabilidad de encontrar un donante en una población particular, compatible para determinado receptor y estimar los tiempos de espera, así como

para obtener un mejor pronóstico en la supervivencia del injerto al encontrar un binomio HLA compatible.

Debido a lo anteriormente descrito, surge la necesidad de determinar las frecuencias alélicas y haplotípicas de los genes pertenecientes al sistema HLA en la población mestiza mexicana, procedente de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), para lo cual se empleará una población aparentemente no sesgada de pacientes dentro del protocolo de trasplante renal y sus potenciales donadores sanos, así como pacientes en lista de espera del protocolo de donador fallecido, que acudieron al laboratorio de Histocompatibilidad del Banco Central de Sangre de la Unidad Médica de Alta Especialidad-Hospital de Especialidades, del Centro Médico Nacional SXXI (BCS UMAE-HE CMN SXXI) durante el periodo de 2005 a 2011.

### 3. ANTECEDENTES

---

#### 3.1. Generalidades históricas del descubrimiento del MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad)

El descubrimiento del MHC se originó a partir del estudio de la biología de los tumores, en especial el trasplante de tumores alogénicos, entendiéndose como alogénico a aquel tejido perteneciente a un individuo de la misma especie pero no de la misma estirpe que la de dicho individuo. Los primeros estudios comenzaron en el año 1900, cuando los genetistas Ernest Tyzzer y Clarence Little descubrieron a partir de trasplantes entre descendientes de cruces de ratones, que la susceptibilidad al crecimiento de tumores alogénicos estaba genéticamente determinada por unos 15 genes, aún desconocidos en aquel tiempo. <sup>(1) (2)</sup>

Posteriormente, en el año 1936, el genetista George Snell *et al.*, en los laboratorios Jackson, realizaron estudios sobre los genes que conferían resistencia al tumor y su relación con el rechazo a implantes entre ratones de cepas endogámicas como de entre cepas distintas. <sup>(1)</sup> En el experimento de Snell, cuando se realizaron injertos de piel entre las cepas endogámicas, el órgano fue aceptado, mientras que los injertos a las cepas distintas fueron rechazados. Dicho estudio lo llevó a concluir que el reconocimiento de un tejido como propio o extraño es de carácter hereditario y a los genes involucrados los denominó genes de histocompatibilidad o genes H. <sup>(3)</sup>

Por su parte, Peter Gorer, patólogo inglés, caracterizó una considerable cantidad de antígenos, los cuales eran responsables del rechazo no solo de tumores alogénicos, sino también de tejidos sanos alogénicos <sup>(4)</sup>. Él y Snell combinaron sus resultados, con el objetivo de identificar a los genes de importancia responsables de ese rechazo, para ello criaron cepas de ratones congénicos, en las que los ratones son idénticos en todo, excepto en lo que se ha seleccionado que sea diferente. Los análisis de los ratones congénicos, que se seleccionaron por su capacidad para rechazar injertos realizados entre ellos, mostraron que una única

región génica era la principal responsable del rechazo agudo del injerto, éste *locus* concreto identificado en los ratones por el grupo de Snell estaba relacionado con un gen situado en el cromosoma 17 que codifica un antígeno de grupo sanguíneo polimorfo denominado antígeno II y que había sido caracterizado por Gorer; por lo tanto, esta región recibió el nombre de locus de histocompatibilidad 2 o, simplemente, H-2. Inicialmente, se pensó que este *locus* contenía un solo gen que controlaba la compatibilidad de los tejidos. Sin embargo, se observaron una serie de acontecimientos de recombinación ocasionales en el *locus* H-2 durante el cruce de diferentes cepas, que indicaban que contenía varios genes diferentes aunque muy relacionados, cada uno de ellos implicado en el rechazo de injertos. Por lo tanto, el locus H-2 se convirtió en el locus principal de histocompatibilidad en ratón <sup>(5)</sup>. Sin embargo, fue hasta los años 1944-1945 cuando Peter Medawar estableció por primera vez que el rechazo de trasplantes alogénicos estaba causado por una respuesta inmune contra el injerto. <sup>(1)</sup>

A partir de todos estos estudios, la zona génica que controla el rechazo de injertos y que contiene varios genes relacionados se denominó “Complejo Principal de Histocompatibilidad” (MHC por su nombre en inglés: *Major Histocompatibility Complex*). Otros genes que contribuyen en menor medida al rechazo de los tejidos se denominan genes secundarios de histocompatibilidad. <sup>(4) (5)</sup>

Como ya se mencionó, los genes involucrados en la histocompatibilidad varían de un individuo a otro. Esto es atribuible al polimorfismo de dichos genes, los cuales codifican para las moléculas encargadas del reconocimiento tisular. Cuando hablamos de polimorfismo, se hace referencia al hecho que si bien todos los ratones, como los empleados en la investigación de Snell, poseen los genes del reconocimiento de lo propio de lo extraño, existen variaciones entre cada cepa, es decir, formas alternativas del gen, o variantes, que se presentan en una frecuencia estable dentro de una población. <sup>(3)</sup>

### 3.1.1. Descripción del sistema HLA (*Antígenos Leucocitarios Humanos*).

En cuanto a los seres humanos, el descubrimiento del MHC humano, llamado HLA (*Human Leukocyte Antigen*), ocurrió hasta mediados del siglo pasado. Para 1958, Jean Dausset, Jon van Rood y Rose Payne publicaron tres artículos en los que sientan las bases de lo que sería la formación del complejo HLA, en humano. Jean Dausset, *et al.*, demostraron por primera vez que los pacientes que rechazan los trasplantes de riñón o que presentan reacciones a los leucocitos en las transfusiones, contienen elevadas concentraciones de anticuerpos circulantes dirigidos hacia los antígenos presentes en la superficie de los leucocitos del donante, tanto de la sangre como del órgano donado. A este suero que reacciona en contra de células de individuos alogénicos se le conoce como aloantisuero, y se dice que contiene aloanticuerpos que están dirigidos contra los aloantígenos. Se supuso que, al igual que en los ratones, estos eran genes polimórficos que variaban de un individuo a otro. Se recogieron conjuntos de aloantisueros procedentes de donantes inmunizados con aloantígenos, como las mujeres multíparas (inmunizadas por los aloantígenos paternos expresados por el feto durante el embarazo), voluntarios inmunizados activamente y receptores de transfusiones o trasplantes. Estos sueros se compararon según su capacidad de unirse y lisar linfocitos procedentes de diferentes donantes y, gracias a los anticuerpos presentes en aquellos sueros, se identificaron diversos *loci* genéticos polimorfos, agrupados conjuntamente en un único *locus* en el cromosoma 6, cuyos productos son reconocidos por los aloanticuerpos. Como estos aloantígenos se expresan en los leucocitos humanos, se denominaron *Antígenos Leucocitarios Humanos* (HLA). Así, posteriormente se estudiaron a familias completas en busca de armar el mapa del locus del HLA. De hecho, el crédito del descubrimiento del primer antígeno HLA pertenece a Dausset, siendo él quien resaltaría la importancia a futuro de dichos antígenos en los trasplantes, en particular los trasplantes de médula ósea. <sup>(1) (3) (5) (6)</sup>

A principios de la década de 1960, Dausset, van Rood, *et al.* obtuvieron evidencia de que los antígenos HLA son fuertes antígenos de histocompatibilidad, lo cual fue confirmado por Ceppellini *et al.* y Amos *et al.*, al demostrar que injertos de piel entre hermanos HLA-idénticos (que heredaron el mismo haplotipo de HLA de ambos padres) tiene una supervivencia significativamente mayor con respecto a los hermanos que diferían en uno o ambos haplotipos de HLA, con lo que se concluyó que el hecho de que el injerto de piel desencadenara la producción de anticuerpos contra los antígenos de HLA del donador era evidencia de que los antígenos HLA son importantes antígenos de histocompatibilidad.<sup>(1)</sup>

Terasaki *et al.* presentaron en 1965 los primeros datos que sugirieron la correlación entre la compatibilidad de HLA y la supervivencia del aloinjerto renal<sup>(7)</sup>. De hecho, todos los resultados hasta esa fecha sobre injertos renales y de piel, junto con otras evidencias, demostraron que, en efecto, las moléculas de HLA eran en realidad el MHC humano, tal como se había demostrado con el complejo H2 en ratones<sup>(8)</sup>. Para inicios de 1970, ya se había aceptado que la supervivencia de riñones trasplantados entre hermanos HLA-idénticos era superior a cualquier otra combinación; siendo a la fecha, la concordancia de los antígenos *HLA-A*, *-B* y *-DR* entre receptor y donador, tanto vivo como cadavérico, un factor importante a considerar en la aplicación clínica<sup>(1)</sup>.

A pesar de todos estos descubrimientos, hasta ese entonces, el único rol que se le asignaba al MHC era el de rechazo a injertos, esto era un problema para el entender de los inmunólogos, debido a que el trasplante de tejidos no es un fenómeno natural y no existía ninguna razón obvia por la que una serie de genes se hubieran conservado a lo largo de la evolución<sup>(1)</sup>, ¿por qué el genoma reservaría éstos grandes segmentos génicos? Las primeras respuestas a esta interrogante vinieron de estudios en ratones.

A partir de las décadas de 1960 y 1970 se descubrió la gran importancia de los genes del MHC en la respuesta inmunitaria frente a antígenos proteicos.

Estudios realizados en 1963 por Green, Paul y Benacerraf demostraron que, en cobayos endogámicos, la respuesta inmune contra antígenos polipeptídicos sintéticos estaba genéticamente controlada por un solo gen.<sup>(9)</sup> Simultáneamente, en 1968, McDevitt, Chinitz y Tyan mostraron que la habilidad de los ratones para desarrollar respuesta de anticuerpos ante una serie de antígenos polipeptídicos sintéticos era un rasgo genético ligado al complejo H-2, dando lugar al concepto de genes de respuesta inmune (*Ir*), los cuales controlan respuestas inmunes específicas<sup>(10)(11)</sup>. En otras palabras, ambos grupos de investigación comprobaron que cepas consanguíneas de cobayos y ratones diferían en su capacidad para elaborar anticuerpos frente a polipéptidos sintéticos simples y que esta respuesta se heredaba con un patrón mendeliano dominante. Ahora se sabe que los genes *Ir* son genes que codifican moléculas del MHC que difieren en su capacidad para unirse y presentar péptidos derivados de diversos antígenos proteínicos. Las cepas sensibles heredan los alelos del MHC cuyos productos se unen a dichos péptidos, formando complejos péptido-MHC que pueden ser reconocidos por los linfocitos T cooperadores. Las cepas no sensibles, en cambio, expresan moléculas del MHC que no son capaces de unirse a péptidos derivados de esos antígenos y, por lo tanto, no pueden generar linfocitos T cooperadores ni anticuerpos específicos para el antígeno.<sup>(1)(3)(5)</sup>

En 1972, Kindred y Shreffler reportaron por primera vez que la cooperación entre células T y B requería compatibilidad de sus moléculas del MHC para la interacción de dichas células. Un año después, se mostró que ello mismo era necesario para la interacción del antígeno asociado a macrófago con las células T<sup>(3)(12)(13)</sup>. Sin embargo, Rolf Zinkernagel y Peter Doherty fueron los primeros en demostrar (en 1974) el papel crítico de los genes del MHC en la respuesta inmune mediada por los linfocitos T, ya sean T citotóxicos (CD8+) como T cooperadores (CD4+); ya que descubrieron que las células T sólo reconocían antígenos extraños cuando el antígeno era presentado por células que compartieran los mismos antígenos de MHC de la célula presentadora de antígenos inicial. Este hecho explicaba todos los experimentos sobre los efectos del gen *Ir* y la necesidad de histocompatibilidad para la interacción entre células del sistema inmune. A dicho

fenómeno, que consiste en que los péptidos se unan a las moléculas de MHC y que dichos complejos sean reconocidos en conjunto en la superficie celular por el receptor de las células T, se le denomina **restricción por MHC**. Este fenómeno también explicaría el aloreconocimiento, el cual involucra el reconocimiento, por parte de los linfocitos T, de complejos de péptidos alogénicos unidos a moléculas HLA propias, o bien de moléculas de HLA y sus péptidos de unión. Así mismo, también se observa que existen limitaciones en la habilidad de ciertas moléculas HLA para unirse a todo tipo de péptidos. Sin embargo, más allá de todos estos descubrimientos, ellos propusieron que todo esto explicaría cómo las moléculas del MHC son fuertes antígenos de histocompatibilidad y que pueden incluso, predisponer a enfermedades. <sup>(1) (4) (6) (14) (15)</sup>

### **3.2. Organización genómica del HLA.**

El complejo genético de HLA se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en el segmento 21.2-21.31 y se encuentra entre las primeras regiones de multi-megabases del genoma humano en ser completamente secuenciadas <sup>(16) (17)</sup>. Con 224 *loci* identificados, de los cuales se estima que 128 son expresados, en una secuencia de aproximadamente 3.6 megabases (Mb), el MHC es por mucho la región más polimórfica de todo el genoma humano, así como la región genéticamente más densa. El promedio de densidad génica (incluyendo pseudogenes) a lo largo de toda la secuencia es de 1 gen por cada 16 kilobases (Kb) con distintas variaciones regionales. En términos genéticos clásicos, el MHC se extiende aproximadamente 4 centimorgans (cM), lo que significa que se produce entrecruzamiento dentro del MHC con una frecuencia de alrededor de 4% en cada meiosis <sup>(17) (5)</sup>. La región del MHC consta de una serie de genes que se encuentran agrupados como clase I, clase II y clase III. Los genes de clase II se localizan en posición centromérica, mientras que los genes de clase I se orientan hacia el telómero, los genes de clase III están localizados entre estas dos regiones génicas. Sin embargo, análisis realizados a las regiones inmediatas

de dicho segmento, revelan que las regiones “clásicas” de clase I y II se extienden mas allá de lo que previamente se pensaba, estas regiones son referidas como regiones “extendidas” de clase I y II. El MHC extendido para humanos (xMHC) cubre un total de 7.6 Mb e incluye 421 *loci*, de los cuales 252 se clasifican como genes expresados (de los que el 28% poseen alguna función en la inmunidad), 30 se describen como transcritos y 139 como pseudogenes. <sup>(1) (16) (17) (18)</sup>

Los genes localizados en las regiones I y II codifican antígenos de superficie, mientras que los genes de la región III codifican para diversas proteínas solubles involucradas en la inflamación, incluyendo C2 y C4 de la vía clásica del complemento, el factor B de la vía alterna, la 21-hidroxilasa A y B y la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF), ésta última es en ocasiones referida como región de clase IV <sup>(6) (17) (19)</sup>. Parece ser que la región de clase III posee nulos o escasos pseudogenes en contraste con las regiones de clase I y II, en donde se encuentran de forma abundante. Una posible explicación para mantener altos niveles de pseudogenes sería por su participación en la generación de nuevos alelos por conversión génica, fenómeno que ha sido observado en otros *loci* de expresión inmune en el humano <sup>(17)</sup>.

La región clase I es la región más telomérica y abarca un segmento cromosómico de unas 1600 Kb. Comprende seis subgrupos de genes cuya nomenclatura está relacionada con el orden cronológico de su descripción, estructura, funcionalidad y patrón de expresión celular. A este grupo pertenecen los genes *HLA-A*, *-B* y *-C*, también denominados “clásicos” o *Ia*, los cuales fueron los primeros en ser descritos dentro del sistema HLA y codifican para las cadenas pesadas de las moléculas de clase I. Por su parte, los genes de clase I “no clásicos” o *Ib* son *HLA-E*, *-F* y *-G*, los cuales codifican para proteínas estructuralmente similares a las de los genes clásicos y se diferencian por su restringida expresión tisular y su bajo polimorfismo <sup>(20)</sup>; se sabe que las proteínas HLA-E, -G tienen una función en el reconocimiento antigénico por las células *Natural Killer* (NK), sobre todo antígenos glicosilados <sup>(5) (18)</sup>. Cabe mencionar que en la región de clase I se encuentran también los genes clase I-like *MICA* y *MICB*, cuyo perfil de expresión sugiere un

posible rol en el sistema inmune de la mucosa del intestino y otros tejidos, y los pseudogenes *HLA-H*, *-J*, *-K* y *-L*, que tienen en común la presencia de deleciones que generan codones de terminación prematuros, en particular el pseudogen *HLA-H* parece estar implicado en el metabolismo del hierro <sup>(5) (18) (20)</sup>.

La región de clase II es la región más centromérica del sistema y comprende unas 900 Kb. Esta región es particularmente notable porque casi todos los genes que se encuentran en ella desempeñan una función inmunitaria <sup>(17)</sup>. Consiste en tres subregiones, cada una contiene genes A y B, que codifican para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente. Esas subregiones, de centrómero a telómero son: *HLA-DP*, *-DQ* y *-DR*. Los genes de clase II se definen con la letra D, seguida de la inicial de la subregión (P, Q o R). Cada subregión se compone a su vez de varios genes <sup>(20)</sup>. Por ejemplo, la familia de genes que codifican para la proteína DR consiste en un único gen *DRA* y más de 9 genes *DRB* (que van desde *DRB1* hasta *DRB9*). El gen *DRA* codifica para la cadena constante  $\alpha$ , la cual se une a las cadenas  $\beta$  codificadas por los genes *DRB*. Las especificidades del antígeno HLA-DR están determinadas por las cadenas polimórficas DR $\beta$ 1, codificadas por los alelos *DRB1*. Los haplotipos HLA de ciertos alelos *DRB1* contienen vinculados específicamente a los locus *DRB3*, *DRB4* o *DRB5*. Cada familia DP y DQ tienen un gen expresado para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y pseudogenes adicionales no expresados. Los productos de los genes *DQA1* y *DQB1* se asocian para formar las moléculas DQ y los productos de los genes *DPA1* y *DPB1* forman a las moléculas DP <sup>(6)</sup>.

Entre las subregiones *-DP* y *-DQ* aparecen otra serie de genes, éstos son *-DN*, *-DO*, *-DMA* y *-DMB*. Estos dos últimos, codifican para una molécula similar a las de clase II, la proteína HLA-DM, que interviene en la unión del péptido a las moléculas de clase II. Además, en esta misma zona también se han descrito a los genes *PSMB8* y *PSMB9* que codifican componentes del proteosoma responsables de transformar proteínas en péptidos, así como a los genes TAP (*TAP1* y *TAP2*) que codifican para proteínas transportadoras de péptidos (transportador asociado al procesamiento antigénico) del citosol al interior del retículo endoplásmico para

su unión a las moléculas HLA clase I y formar el complejo HLA-péptido (Figura 1) (5) (20).

Existen formas alternativas o variantes de genes, con frecuencias fijas en los diferentes miembros de la población. Dichos genes se consideran polimorfos y cada una de las variantes comunes de un gen polimorfo se conoce con el nombre de alelo. Para algunos *loci* del HLA se han identificado más de 250 alelos mediante análisis serológicos. La secuenciación molecular ha demostrado que un alelo simple del HLA definido con pruebas serológicas puede constar de múltiples variantes que difieren ligeramente. Por consiguiente, el polimorfismo es incluso mayor del previsto a partir de los estudios serológicos (5).

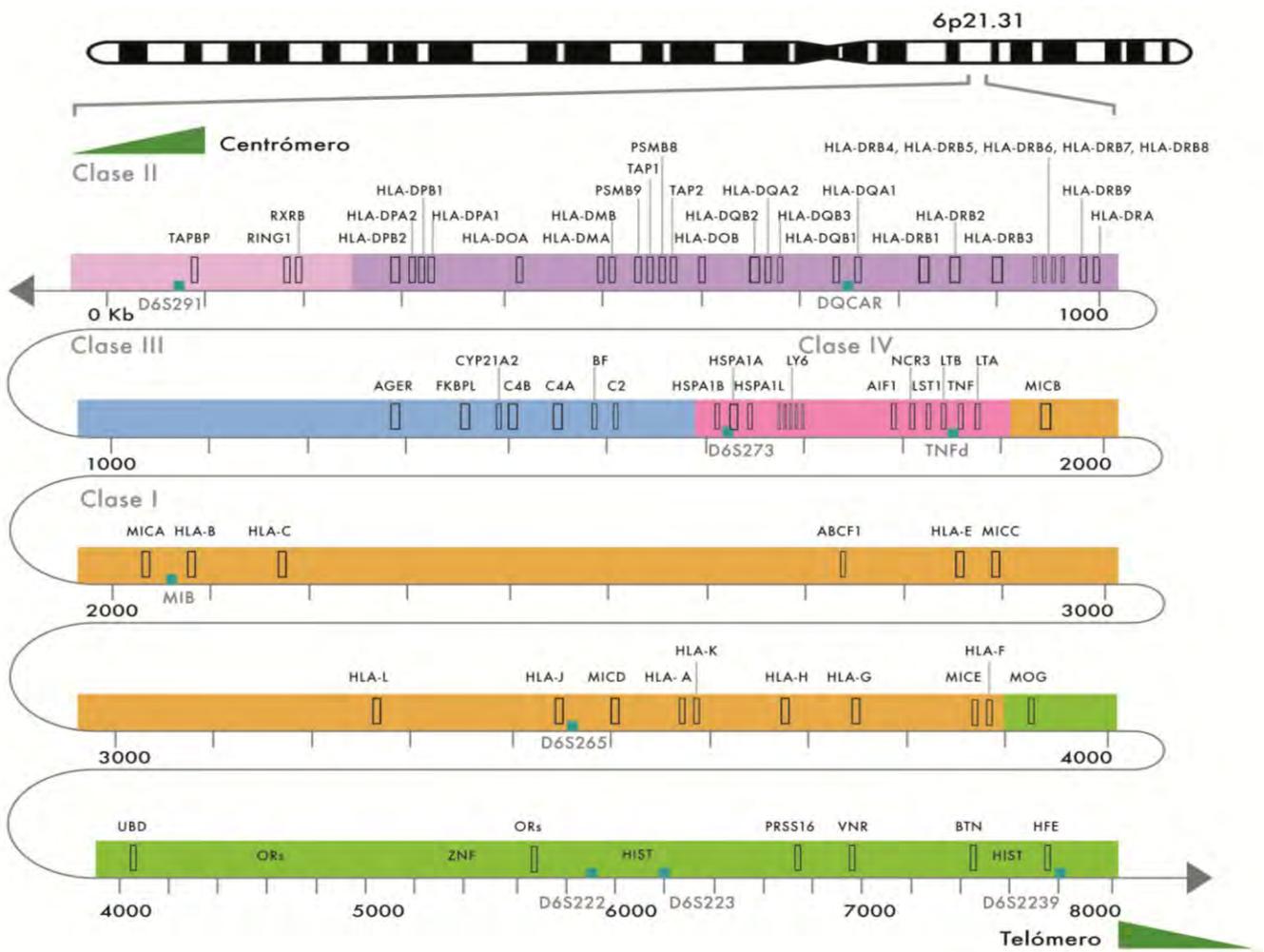


Figura 1. Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad humano (MHC). Se muestra el mapa genético del MHC, de telómero a centrómero del brazo corto del cromosoma 6, dentro del segmento 21.31.

### 3.2.1. Polimorfismo y surgimiento de nuevos alelos.

Ningún *loci* en el ser humano es tan polimórfico como los *loci* del sistema HLA. Y para el gen *HLA-B* se ha confirmado que es la región más polimórfica de todo el genoma<sup>(18)</sup>. A la fecha, se conocen 6725 alelos para el sistema HLA clase I y 1771 alelos para la clase II, de los cuales 2132 alelos corresponden al *locus* A, 2798 alelos al *locus* B, 1196 alelos al *locus* DRB1 y 179 alelos al *locus* DQB1<sup>(21)</sup>; para darnos una idea de la inmensidad de dicho polimorfismo, podría decirse que el número teórico de posibles fenotipos que resultan de todas las combinaciones de alelos HLA es más grande que la población humana en la Tierra<sup>(22)</sup>. Debido a éste extenso polimorfismo, el sistema HLA es responsable de las mayores diferencias inmunogenéticas entre individuos de una población y entre poblaciones<sup>(23)</sup>.

Esta variabilidad es aparentemente mantenida en las poblaciones humanas dada la necesidad de presentar exitosamente un amplia variedad de péptidos exógenos procesados al receptor de células T. Se piensa que este gran polimorfismo es conducido y mantenido por la constante interacción entre nuestro sistema inmune y los patógenos infecciosos<sup>(17) (22)</sup>.

La gran mayoría de los polimorfismos encontrados en los genes de clase I y II ocurren en los exones que codifican para los dominios  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 (clase I, exones 2-3) y  $\alpha$ -1 y  $\beta$ -1 (clase II, exón 2), en los cuales se unen los péptidos procesados<sup>(22)</sup>.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (*single-nucleotide polymorphism*, SNP) son el tipo de variación más común, y de estos los SNPs codificantes (cSNPs) son los subtipos de variación más informativos. Sin embargo, el polimorfismo no está sólo restringido a SNPs, el MHC es rico en polimorfismos de delección/inserción (*Deletion/Insertion Polymorphisms*, DIPs)<sup>(18)</sup>.

Cabe mencionar que los alelos ancestrales del sistema HLA que definen serotipos específicos probablemente son anteriores a la aparición de seres humanos como especie y también se presentan en otros primates. Sin embargo, la microvariación dentro de los serotipos es un fenómeno tal vez más reciente. Por ejemplo, los inmigrantes que atravesaron el estrecho de Bering hacia América hace más de 10000 años probablemente poseían el alelo DRB1\*08:02 en alta frecuencia, mientras que hoy en día, en los nativos americanos, algunas variantes sutiles como DRB1\*08:07 y \*08:11, se encuentran en la misma proporción que DRB1\*08:02. Estas variantes se cree que han surgido en los individuos con DRB1\*08:02 a través de mutaciones en las células germinales. Nuevos alelos parecen emerger a una velocidad bastante alta y llegan a fijarse en las poblaciones, en teoría, si estos proveen una ventaja selectiva en presentar péptidos de organismos infecciosos. Los nuevos alelos son generados vía mutaciones puntuales, recombinación y conversión génica <sup>(22)</sup>. A partir de esto podemos entender la vasta cantidad de polimorfismos dentro del sistema HLA.

### 3.2.2. *Desequilibrios de ligamiento*

Además de la presencia de polimorfismos, debemos considerar otros aspectos dentro del comportamiento genético y herencia del sistema HLA en las poblaciones. Cabe señalar que el conjunto de alelos del MHC presente en cada segmento cromosómico se denomina haplotipo del MHC. Dado que los genes HLA están cercanamente unidos (Figura 1), el MHC es heredado completamente como un haplotipo HLA en un patrón mendeliano de parte de cada padre, es decir, se hereda en bloque en un gran porcentaje de las ocasiones. Todos los individuos heterocigotos tienen dos haplotipos HLA. A partir de los estudios de la segregación de los haplotipos HLA dentro de las familias, se sabe que de dos hermanos, existe el 25% de posibilidad de ser genóticamente idénticos en el HLA, 50% de probabilidad de ser haploidénticos (es decir, que compartan un haplotipo) y el 25% de probabilidad de que no compartan ningún haplotipo HLA (Figura 2). <sup>(5) (6) (23)</sup>

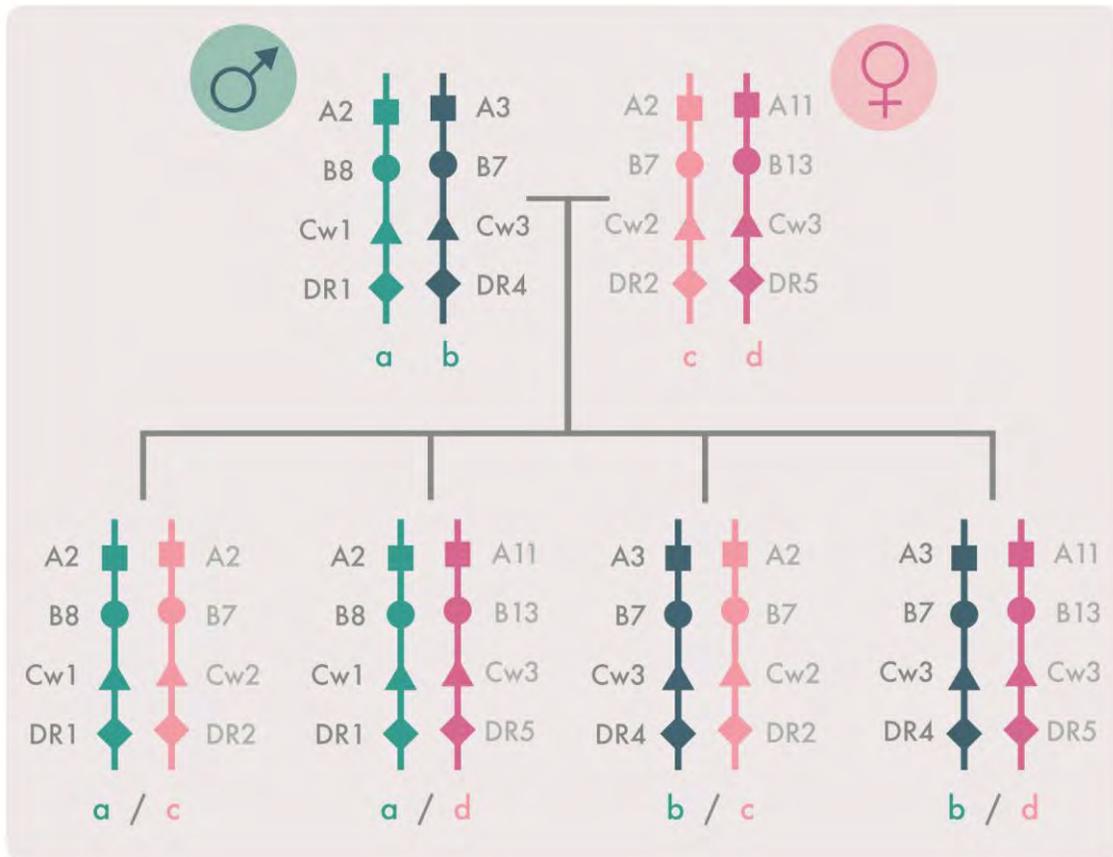


Figura 2. Herencia mendeliana de los haplotipos de HLA demostrada en estudios familiares.

En los seres humanos, determinados alelos HLA presentes en diferentes *loci* se heredan conjuntamente con más frecuencia de lo que cabría esperar por una asignación al azar, ello es un fenómeno que se denomina desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium, LD*). Es decir, es la fuerza con la que se mantienen juntos los alelos en un bloque. Por ejemplo, *HLA-A1, -B8, -DR17* es el haplotipo más común de HLA entre los europeos, con una frecuencia de 0,05.<sup>(6)</sup>  
(23)

Este fenómeno tiene importantes implicaciones biológicas y clínicas. En grandes poblaciones con LD, como las de los grupos humanos, las frecuencias genéticas alcanzan rápidamente el equilibrio dentro de la población después de una o dos generaciones, a no ser que algún tipo de selección positiva o negativa esté

actuando sobre el gen y que rompa dicho equilibrio. A diferencia de cuando existe el equilibrio, la ocurrencia de cualquiera de los dos alelos HLA en un haplotipo particular debería ser al azar, es decir, un evento independiente gobernado solo por las frecuencias genéticas de la población. <sup>(24)</sup>

Los efectos del LD frecuentemente pueden ser vistos a través de un haplotipo completo que incluye a los genes del MHC de clase I, II y III. El LD es especialmente alto entre moléculas de HLA clase II, en los alelos *HLA-DRB1* y *-DQB1* y entre los alelos *HLA-B* y *-C*. Aunque las bases evolutivas para el LD son especulativas, ciertas combinaciones de genes HLA podrían haber provisto de ventajas de supervivencia selectiva en algunas poblaciones humanas, y se ha observado que éste mismo varía dentro de cada grupo poblacional <sup>(24)</sup>. De hecho, los patrones de LD son importantes para desentrañar la historia evolutiva de los seres humanos, que incluye la identificación de efectos demográficos como el crecimiento de la población, el efecto “cuello de botella” en el que una reducción temporal en el tamaño de la población ocasiona la pérdida de variación genética, la mezcla de dos o más poblaciones genéticamente distintas y la detección de selección natural en una población <sup>(25)</sup>. He aquí que la existencia de regiones conservadas de DNA, mantenidas de generación en generación a través de una relativa ausencia de recombinación genética, han sido descritas ampliamente para el sistema genético de HLA <sup>(26) (27)</sup>.

Otra ventaja de conocer el LD es que, al estudiar los marcadores conocidos que muestren un fuerte LD con la variante causal de una enfermedad, o la susceptibilidad a una, dichas variantes pueden ser detectadas a través de la presencia de asociaciones en sitios cercanos, obteniéndose la mayor cantidad de información sin la necesidad de determinar el genotipo de todas las variaciones en la región de interés. <sup>(28) (25)</sup>

Finalmente, el LD posee aplicaciones clínicas importantes, especialmente en la selección de donador para trasplante. Los donadores para pacientes con cierto fenotipo de HLA como HLA-A2/-B35, se encontrarían con mayor facilidad dentro de la población puesto que los alelos de estos antígenos se encuentran en un

fuerte LD en la población mestiza mexicana. En contraste, donadores para pacientes con un fenotipo HLA que no muestre LD son proporcionalmente más difíciles de encontrar. <sup>(4)</sup>

### 3.3. Nomenclatura

Dado el alto grado de polimorfismo en las moléculas HLA, surgió la necesidad de una nomenclatura sistemática. La responsabilidad de nombrar los nuevos genes y secuencias alélicas HLA, así como su control de calidad, corre a cargo del comité de Nomenclatura WHO. Existen actualmente en uso dos tipos de nomenclatura HLA. La forma serológica, establecida en 1975 y modificada en 1984, se encuentra basada en la especificidad (epítomos) de los productos génicos del HLA, los cuales habían sido definidos por técnicas inmunológicas <sup>(4)</sup>. Para entonces ya se habían introducido los términos **clase I** para describir a los antígenos A, B y C y **clase II** para describir a los antígenos DR, DQ y DP. La segunda forma, la molecular, con uso oficial en la actualidad, fue establecida en 1987 y está basada sobre los alelos definidos por secuenciación de los nucleótidos. <sup>(4)(1)</sup>

En la nomenclatura molecular se siguen los siguientes principios: las letras HLA, que designan el sistema genético, seguido de un guión, las letras mayúsculas (ej. A, B, C, DR, DQ) designan las series segregadas, mientras que la parte numérica designa la especificidad. Cabe aclarar que la “w” se remueve del nombre de los alelos HLA-C, pero es retenida en los nombres de los antígenos HLA-C para evitar la confusión con los factores del sistema del complemento <sup>(4)(23)</sup>. Actualmente, cada nombre de un alelo HLA tiene un número único de cuatro, seis u ocho dígitos, dependiendo de su secuencia y separados por dos puntos. La longitud de la designación del alelo depende de la secuencia de éste y de la de su pariente más cercano. Todos los alelos reciben por lo menos un nombre de cuatro cifras, que corresponde a los primeros dos conjuntos de dígitos; seis y ocho dígitos se asignan solamente cuando son necesarios (Figura 3). <sup>(16)(21)</sup>

Los primeros dos dígitos describen la familia alélica, que corresponde a menudo al antígeno serológico, llevado por un alotipo, el tercero y cuarto dígitos se utilizan para enumerar los subtipos (alelos, propiamente dichos), éstos números son asignados de acuerdo con el orden en que se han determinado las secuencias de DNA y que señalan la especificidad dentro del grupo. Los alelos cuyos números difieren en los primeros cuatro dígitos deben diferir en una o más sustituciones del nucleótido que cambien la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Los alelos que solo difieren en una sustitución sinónima del nucleótido dentro de la secuencia codificante son distinguidos por el uso del quinto y sexto par de dígitos. Los alelos que se diferencian solamente por cambios en la secuencia de los intrones o en las regiones 5' o 3' no traducidas que flanquean los exones y los intrones son distinguidas por el uso del cuarto par de dígitos <sup>(idem)</sup>.

Además del número único del alelo hay los sufijos opcionales adicionales, que se pueden agregar a un alelo para indicar su estado de la expresión. A los alelos que contienen un cambio en la secuencia que impide la expresión de la molécula (generalmente codón de paro) y que por lo tanto no contribuyen al fenotipo de la célula, se les asigna el sufijo "N" de "Null". El sufijo "L" se utiliza para indicar un alelo que se ha demostrado tener baja expresión en la superficie de la célula en comparación a los niveles normales. El sufijo "S" ayuda a denotar un alelo que codifica para una proteína que es soluble, es decir que se secreta y por lo tanto no está presente en la superficie de la célula. Una "C" añadida como sufijo indica un producto del alelo que esté presente en el citoplasma pero no en la superficie de la célula. Una "Q" añadida como sufijo indica una expresión aberrante, donde hay una cierta duda de si una proteína está expresada. Una letra "Q" es agregada como sufijo cuando la expresión de un alelo es "cuestionable", dado que la mutación considerada en el alelo se ha demostrado previamente a la expresión normal. Hasta abril del 2012, ningún alelo ha sido nombrado con los sufijos "C" o "A" <sup>(16) (21) (23)</sup>. Actualmente, las estrategias de tipificación basada en la secuencia (SBT) empleadas en los laboratorios, usan las secuencias de los exones 2 y 3 para el análisis de HLA de clase I y el exón 2 para HLA clase de II (secuencias de los dominios de unión de péptidos). Debido a la naturaleza del análisis por SBT las

combinaciones de muchos pares de alelos puede dar lugar a ambigüedades en la asignación de los resultados, es decir, no resuelven la tipificación a nivel de un solo alelo, por lo que solo es posible resolver la presencia o ausencia de un grupo de alelos estrechamente relacionados, frecuentemente denominados “cadenas de alelos”. Por ejemplo, para el caso de *HLA-A\*24*, se han descubierto 21 alelos que comparten las mismas secuencias de los exones 2 y 3 con *HLA-A\*24:02:01:01*. Para resolver este problema, en abril del 2010 se introdujeron los sufijos P y G. El sufijo P se refiere a "péptidos/proteínas". Todos los alelos de HLA con las mismas secuencias de nucleótidos que codifican para los dominios de unión del péptido se les asigna el sufijo P siguiendo el alelo de dicho grupo con el menor número alelico. En este caso, el grupo de alelos *HLA-A\*24* que comparten las mismas secuencias con *HLA-A\*24:02:01:01* se asignan como *HLA-A\*24:02P*. O bien, se puede simplificar como *HLA-A\*24:02:01G*, colocando siempre la letra G posterior al tercer campo de designación del alelo que posea la numeración más baja dentro del grupo <sup>(29)</sup> <sup>(30)</sup>.

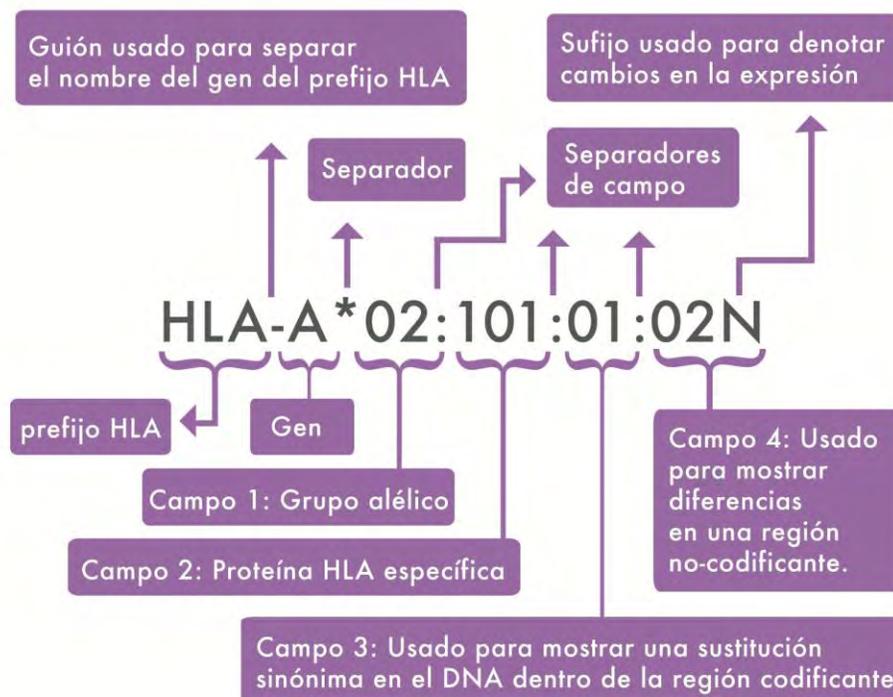


Figura 3. Ejemplo de nomenclatura en el sistema HLA. Se indica la descripción para cada uno de los campos empleados para nombrar el alelo.

Los antígenos oficialmente aceptados, y que son útiles para fines de investigación inmunológica son seis: HLA-A, -B, -C, -DR, -DP y -DQ los cuales fueron designados por el *locus* que determina la especificidad antigénica seguido de un número, los antígenos que aún no se han reconocido oficialmente se designan con la letra "W" (del inglés *workshop* o taller en español) colocada antes del número y se trata de una nominación tentativa <sup>(16)</sup> <sup>(31)</sup>.

En la práctica, cualquier designación que comprenda los cuatro dígitos después de la letra o letras que indican el nombre del gen se considera como tipificación de alta resolución, mientras que la detección de los dos primeros dígitos sin ambigüedades se denomina baja resolución o equivalente alélico. Mientras que la resolución intermedia se consigue, si la metodología analítica lo permite, al obtener un par de alelos de alta resolución como posibles antígenos, indicándose con los dos primeros dígitos, es decir, la determinante serológica seguida, en orden ascendente, de los números de los alelos posibles separados entre sí por una diagonal <sup>(23)</sup>.

En la siguiente tabla se muestra un ejemplo del manejo de la nomenclatura anteriormente descrita <sup>(21)</sup> <sup>(30)</sup>:

Nomenclatura	Indica
HLA	La región HLA y el prefijo para un gen HLA
<i>HLA-DRB1</i>	Un locus particular de HLA. Ej. DRB1
<i>HLA-DRB1*13</i>	Un grupo de alelos que codifican para el antígeno DR13 u homología de secuencia con otros alelos DRB1*13
<i>HLA-DRB1*13:01</i>	Un alelo específico HLA.
<i>HLA-DRB1*13:01:02</i>	Un alelo que difiere solo por una mutación sinónima de DRB1*13:01:01
<i>HLA-DRB1*13:01:01:02</i>	Un alelo que contiene una mutación fuera de la región codificante de DRB1*13:01:01:01
<i>HLA-A*24:09N</i>	Un alelo "nulo", un alelo que no es expresado
<i>HLA-A*30:14L</i>	Un alelo que codifica una proteína con expresión significativamente reducida o "baja" ( <i>Low</i> ) en la superficie celular.
<i>HLA-A*24:02:01:02L</i>	Un alelo que codifica una proteína con expresión significativamente reducida o "baja" ( <i>Low</i> ) en la superficie celular, donde la mutación se encuentra fuera de la región codificante.
<i>HLA-B*44:02:01:02S</i>	Un alelo que codifica una proteína, la cual es expresada sólo como una molécula "secretada".

<i>HLA-A*32:11Q</i>	Un alelo que tiene una mutación que previamente ha mostrado tener un efecto significativo en la expresión en la superficie celular, pero no ha sido confirmado y su expresión permanece “cuestionable” ( <i>questionable</i> ).
<i>DRB1*01:01:01G</i>	Grupo de alelos que comparten la misma secuencia de nucleótidos que codifican para los dominios de unión del péptido en el exón 2.

### **3.4. Expresión y estructura de las moléculas del MHC**

Las moléculas del HLA normalmente son expresadas constitutivamente en las membranas celulares de muchos tipos diferentes de células. Esto significa que la célula se encuentra continuamente sintetizando y expresando una o más moléculas de HLA. Como ya se mencionó, existen dos tipos principales de productos génicos del MHC, que se denominan moléculas del MHC de clase I y de clase II. Las moléculas de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas, su nivel de expresión varía desde un máximo en células pertenecientes al sistema inmune como los linfocitos T, B y macrófagos, hasta un mínimo en células musculares, glándulas de Brunner duodenales, neuronas del sistema nervioso central y fibroblastos. También se producen en plaquetas y hasta cierto punto en reticulocitos. Finalmente, se han encontrado de forma soluble en el plasma en parte a través de mecanismos secretores activos. En contraste, la expresión constitutiva de las moléculas de clase II, está restringida a relativamente pocas células, principalmente a los linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T activos, células de Langherhans en la piel, otras células de la serie mieloide y algunas células endoteliales (Figura 4) . <sup>(4) (5) (20) (32)</sup>

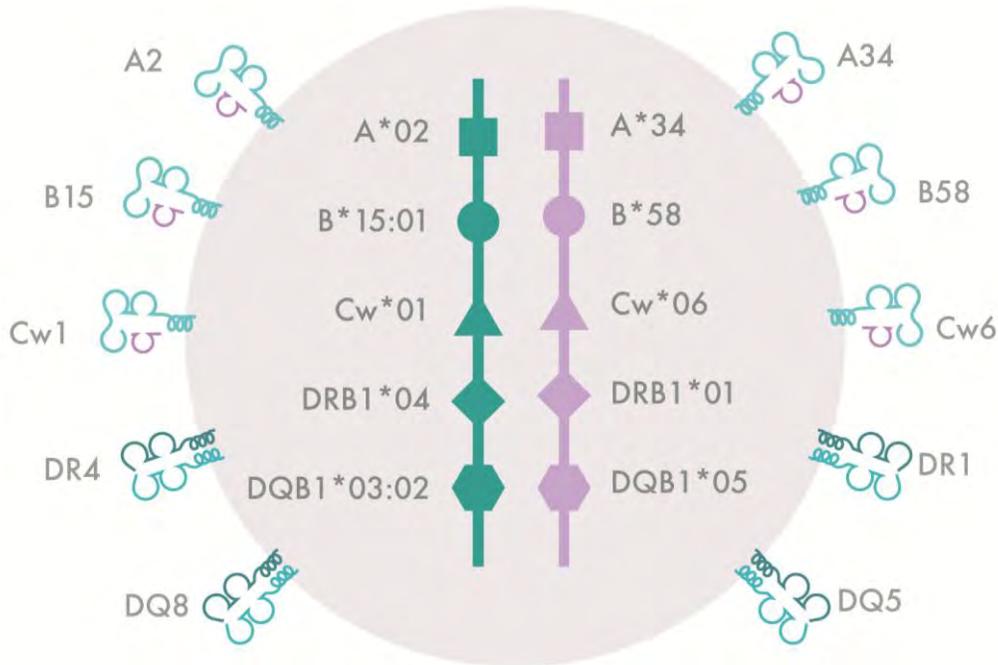


Figura 4. Ejemplo de célula que expresa las moléculas de clase I y II. Se muestran los alelos HLA y las moléculas generadas a partir de estos.

Incluso, durante las respuestas inflamatorias, la expresión de moléculas de clase I y II puede ser incrementada o inclusive inducida en ciertas células que normalmente no las expresan, como los miocitos y hepatocitos. La expresión nueva de moléculas HLA en ciertas condiciones patológicas y fisiológicas puede jugar un rol principal en la patogénesis del proceso de rechazo de aloinjertos y en ciertos tipos de enfermedades autoinmunes. En contraparte, la expresión de éstas podría encontrarse disminuida en algunas células neoplásicas y células infectadas por virus. La ausencia de moléculas del HLA es un mecanismo por el cual, tumores y células infectadas por virus, evaden el reconocimiento inmune por las células T<sup>(4)</sup>.

La naturaleza y origen de los péptidos que se unen a las moléculas de clase I y II es diferente. El complejo peptídico de las moléculas de clase I en la superficie celular es reconocido por el receptor de célula T (TCR) de los linfocitos CD8+, el

cual reconoce un epítipo de los antígenos endógenos sintetizados en el interior de la célula blanco (como proteínas celulares, transformadas o inducidas por microorganismos intracelulares como los virus), mientras que la expresión de las moléculas de clase II se encuentra principalmente restringida a las células presentadoras de antígeno (APC). Las proteínas exógenas provenientes de microorganismos extracelulares que han sido fagocitados, son endocitadas y sometidas a degradación en el compartimento endosomal. El complejo péptido-molécula de clase II es transportado a la superficie celular y es reconocido por el TCR de los linfocitos CD4+ <sup>(5) (6)</sup>. A su vez, también las células NK son reguladas en su función por las moléculas HLA clase I mediante los receptores KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*). Este mecanismo impide a las células NK atacar a células autólogas sanas, gracias a señales inhibitorias que impiden la citotoxicidad y secreción de citocinas, durante el reconocimiento de lo propio <sup>(33)</sup> <sup>(34)</sup>.

En lo que respecta a su estructura, las moléculas de HLA clase I y clase II son glicoproteínas compuestas por dos distintas cadenas proteicas, es decir, por heterodímeros. Las dos cadenas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas debido a que muestra una notable homología estructural con la región constante de las inmunoglobulinas. A pesar de que la configuración tridimensional de las moléculas es muy similar, las cadenas peptídicas para cada clase de moléculas son diferentes <sup>(4) (32)</sup>.

Las moléculas de clase I consisten en cadenas pesadas glicosiladas y unidas a la  $\beta_2$ -microglobulina extracelular ( $\beta_2m$ ). La  $\beta_2m$  humana es no polimórfica, con un peso molecular de 12kDa (*kiloDalton*) y el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 15. La cadena pesada o  $\alpha$  de clase I, con un peso molecular de 45kDa, posee tres dominios extracelulares hidrofílicos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ), una región transmembranal hidrofóbica y un dominio intracelular hidrofílico, en donde se encuentra el C-terminal. Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  contienen secuencias variables de aminoácidos, y estos dominios determinan la especificidad antigénica de las moléculas de HLA clase I. Los dominios  $\beta_2m$  y  $\alpha_3$ , juntos, forman pliegues

parecidos al dominio constante de inmunoglobulina y se encuentran unidos de forma no covalente. La cadena pesada de los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  forman una estructura única que consiste en ocho cadenas  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélices en la cima de la estructura, todas aquellas antiparalelas. Un surco se forma por las cadenas  $\alpha$  y la parte de las cadenas  $\beta$  que las sostienen, dicho lugar es el sitio de unión para el antígeno peptídico procesado. El surco de unión a péptido de la clase I posee capacidad para unir péptidos procesados de 8 a 10 residuos de aminoácidos (Figura 5) <sup>(1) (6) (20) (35)</sup>.

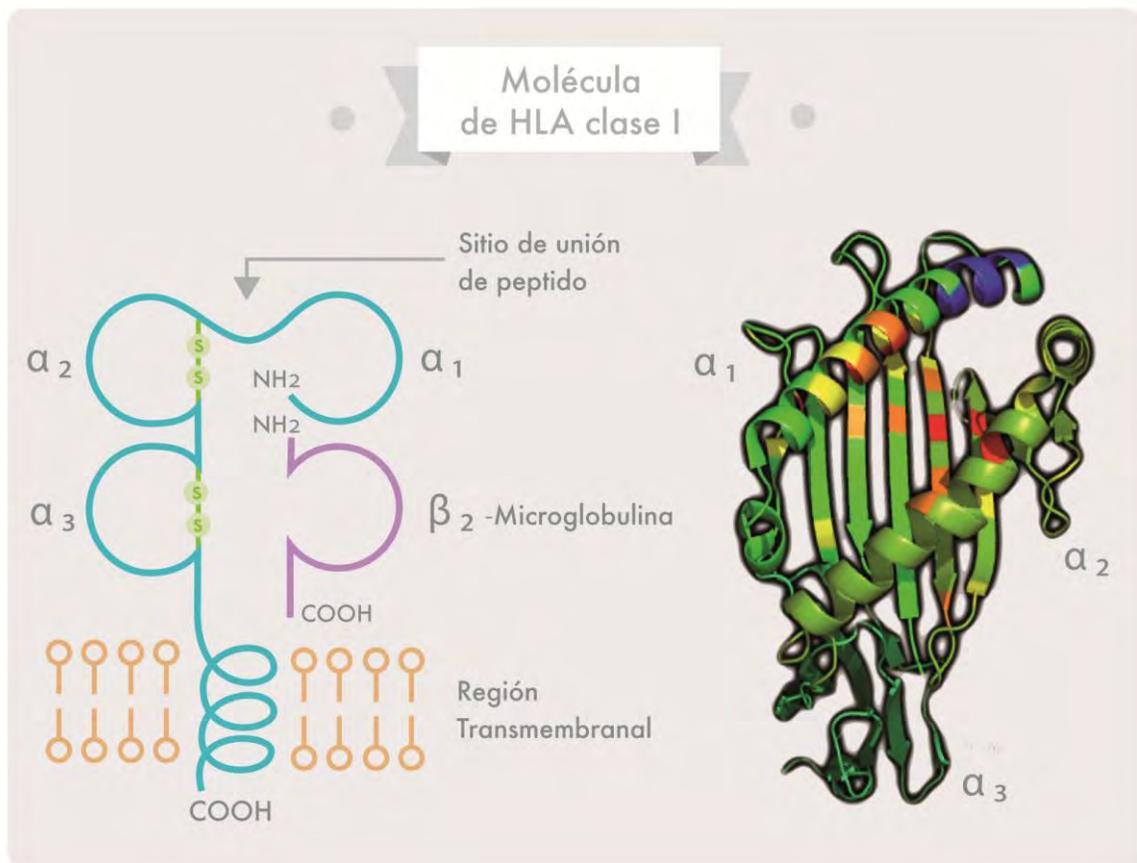


Figura 5. Molécula de HLA clase I. Se muestra gráficamente la molécula de HLA y su organización en la membrana celular (izq.), se observa también la representación tridimensional de la misma (der.).

Los productos de los genes de clase II forman heterodímeros de dos cadenas polipeptídicas,  $\alpha$  y  $\beta$ , glicosiladas, de peso molecular 31-34 kDa y de 26-29 kDa

respectivamente y asociadas no covalentemente. Ambas cadenas poseen una estructura similar y cuentan con tres regiones: la extracelular, una transmembranal y la intracelular. La porción extracelular hidrofílica, tanto de la cadena  $\alpha$  como de la  $\beta$ , se encuentra compuesta por dos dominios ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , o  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , respectivamente) y está anclada a la membrana por una región corta transmembranal y un dominio intracitoplásmico. Los polimorfismos de las moléculas de clase II se encuentran en el primer amino terminal del dominio  $\beta_1$ . Los dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  forman el surco de unión al antígeno. Ambos extremos del surco de clase II se encuentran más abiertos, presentando una capacidad de unión de péptidos de mayor tamaño (12 aminoácidos o más). Por su parte, el dominio  $\beta_2$  contiene una región conservada de unión a la molécula CD4 del linfocito T (Figura 6) <sup>(idem)</sup>.

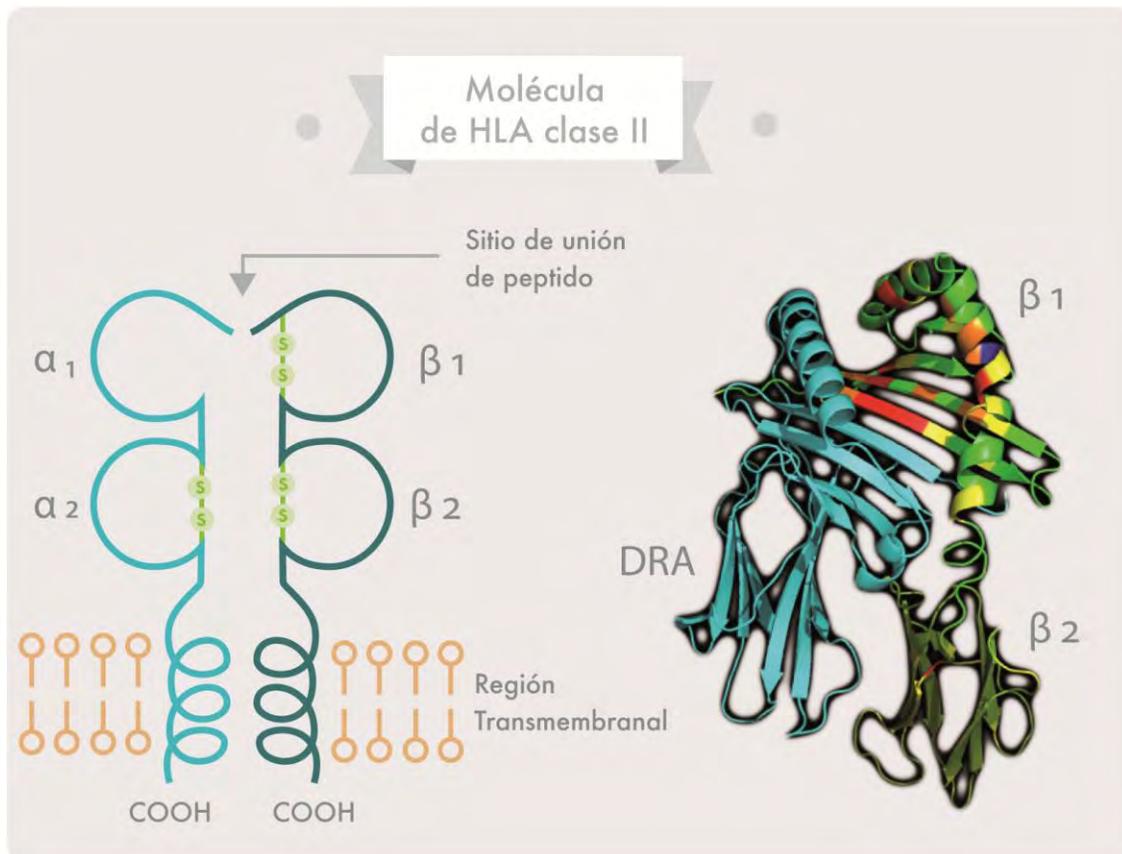


Figura 6. Molécula de HLA clase II. Representación gráfica de la molécula de HLA y su organización en la membrana celular (izq.), se muestra la representación tridimensional de la misma (der.).

Cabe mencionar que en la interacción de la molécula de HLA con el TCR, las moléculas CD8 de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se unen al dominio  $\alpha 3$  de las moléculas de clase I, mientras que las moléculas CD4 de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se unen al dominio  $\beta 2$ , de las moléculas de clase II<sup>(6)</sup>.

En cuanto al procesamiento de antígenos, éste se lleva a cabo de forma distinta de acuerdo al tipo de molécula de MHC. El procesamiento asociado a clase I consiste en la degradación mediante proteólisis en el proteasoma de proteínas citosólicas, lo que da lugar a péptidos que serán transportados hacia el Retículo Endoplásmico (RE) mediante un transportador heterodímero denominado TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*)1/TAP2. Los dímeros MHC clase I- $\beta 2$  microglobulina, formados y estabilizados por la calnexina y calreticulina, sintetizados en el RE se unen al complejo TAP y reciben los péptidos transportados hacia el interior del RE. Los complejos formados de moléculas del MHC y los péptidos unidos, salen del RE a través del aparato de Golgi hacia la membrana celular (Figura 7A)<sup>(5) (20) (36)</sup>.

En el caso del procesamiento de antígenos que se unirán a las moléculas clase II, las proteínas extracelulares se interiorizan en endosomas, donde estas proteínas se escinden mediante proteólisis por enzimas que actúan a pH ácido. Las moléculas del MHC clase II asociadas a la cadena invariante ( $I_i$ ) se transportan desde el RE, en donde son sintetizadas, a las vesículas endosómicas. Aquí, la  $I_i$  se degrada proteolíticamente por diversas catepsinas y la molécula HLA-DM elimina un pequeño péptido residual del  $I_i$ , denominado CLIP y localizado en el sitio de unión con el péptido de la molécula del MHC. Posteriormente los péptidos generados de las proteínas extracelulares se unen a la molécula de MHC de clase II. Finalmente el complejo trimérico, de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del MHC y el péptido, se desplaza a la superficie celular donde es presentado (Figura 7B)<sup>(5) (20) (37)</sup>.

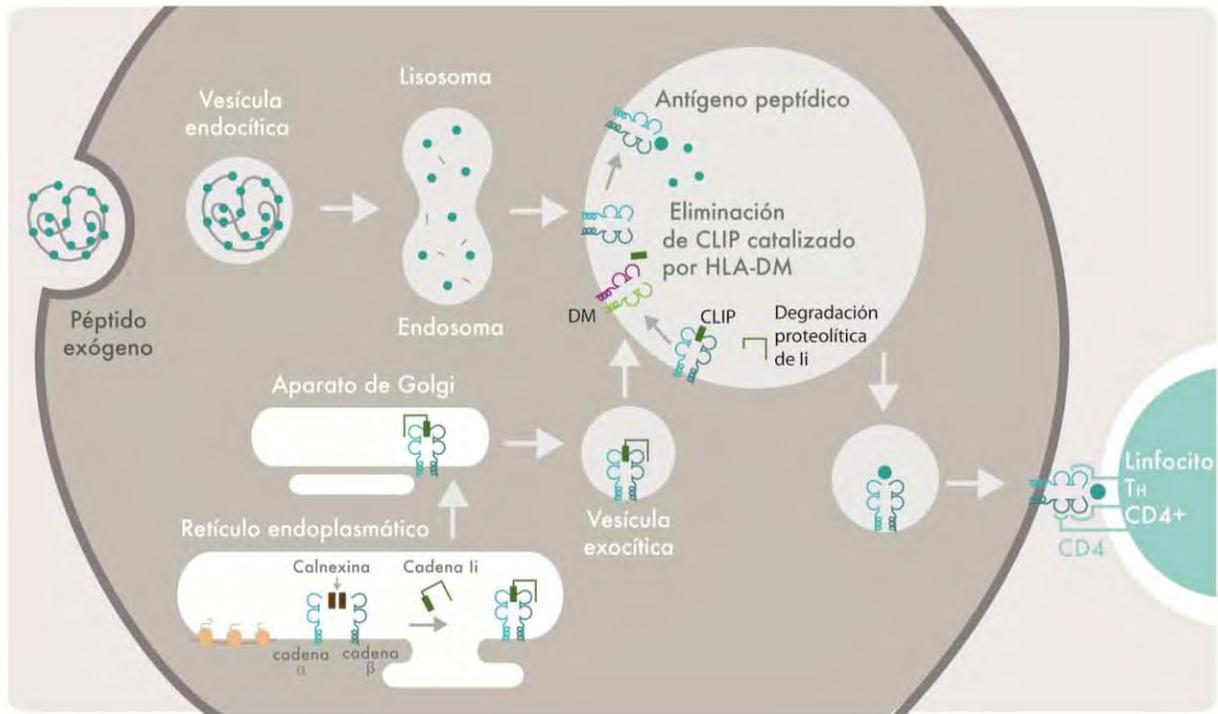
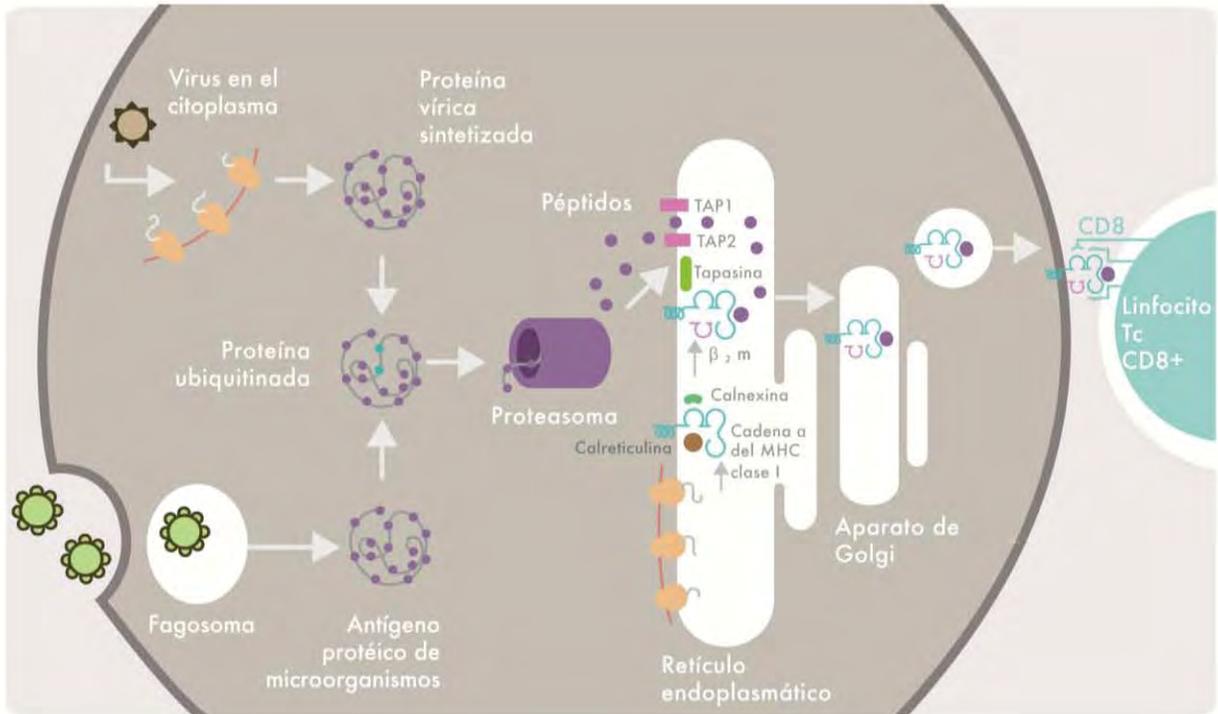


Figura 7. Arriba. Procesamiento antigénico y presentación de antígenos endógenos por el MHC clase I. Abajo. Mismo proceso esquematizado para clase II.

### 3.5. Trasplantes y el sistema HLA

Desde sus comienzos, el trasplante ha representado una opción en el manejo de afecciones y condiciones clínicas en las que se busca recuperar una función perdida, a través de un cambio físico de la unidad funcional anatomofisiológica. Es decir, el trasplante es un proceso por el que se toma un injerto, que consiste en células, como las células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC), tejidos, como la piel, o algún órgano, como el riñón, páncreas, hígado, pulmón, corazón, etc., de un individuo y se coloca en otro individuo habitualmente distinto. En el caso del trasplante de células sanguíneas circulantes o de plasma de una persona a otra se denomina transfusión. El individuo que proporciona el injerto se denomina donador y el que lo recibe, receptor o huésped. <sup>(5) (23)</sup>

Existen distintos tipos de trasplante según la relación existente entre donante y receptor, se denomina trasplante singénico a aquel en el que el injerto procede de un individuo genéticamente idéntico al receptor como en gemelos univitelinos o animales de experimentación seleccionados; se denomina autotrasplante o trasplante autólogo a aquel injerto obtenido previo cultivo o colección del mismo, en el que donante y receptor son el mismo individuo como en trasplantes de piel; alotrasplante o trasplante alogénico es el que se realiza entre dos individuos diferentes pertenecientes a la misma especie y xenotrasplante, en el que el injerto pertenece a un individuo de especie distinta a la del receptor <sup>(23) (38)</sup>.

Una limitación importante para el éxito de los trasplantes es la respuesta inmunitaria del receptor frente al tejido del donador, la pérdida de los injertos se debe a una reacción inflamatoria a la que se denomina rechazo <sup>(5)</sup>. Estas respuestas pueden ser extremas, como en el caso de la Enfermedad Injerto contra Hospedero (EICH) mediada por linfocitos T citotóxicos alorreactivos después de un trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas, o en el caso de un rechazo agudo mediado por anticuerpos específicos anti-HLA preformados después de un trasplante de órgano <sup>(39)</sup>.

Desde el descubrimiento y los posteriores estudios del sistema HLA se encontró que dichos genes son los responsables de que un tejido injertado sea percibido como similar o diferente a los tejidos propios, de ahí que se denominaran genes de histocompatibilidad, puesto que son genes que determinan la compatibilidad tisular entre individuos <sup>(5)</sup>.

Por consecuencia, la tipificación HLA ha sido de vital importancia en la medicina de los trasplantes. En la actualidad se sabe en particular que el polimorfismo del sistema HLA, representa una importante barrera inmunológica en el trasplante de órgano sólido, y aun persiste el riesgo de un rechazo agudo o crónico ocasionado por antígenos del sistema HLA incompatibles entre receptor y donador. Entre los mecanismos que explican esta relación se encuentran el reconocimiento directo o indirecto que hace el receptor de las moléculas HLA no compatibles del donante con la consiguiente estimulación de su respuesta inmune y la concomitante destrucción del tejido no reconocido <sup>(23) (35)</sup>. El número de disparidades incrementa el riesgo de fallo en el injerto y la mejor compatibilidad HLA entre el receptor y donador asegura un trasplante exitoso. Debido a su alto polimorfismo, las moléculas HLA son potentes inductores de la respuesta inmune, desarrollando anticuerpos anti-HLA después de la exposición a aloantígenos durante una transfusión sanguínea, embarazo y trasplantes previos, lo que las convierte, en consecuencia, en una barrera para un trasplante exitoso. <sup>(40)</sup>

### **3.6. *Enfermedades asociadas a HLA***

Se ha encontrado que muchas enfermedades, particularmente de tipo autoinmune, son resultado de la predisposición genética asociada a uno o más alelos HLA (alelos de susceptibilidad); probablemente debidas a un enlace preferencial de los péptidos inmunogénicos particulares, los cuales podrían ser capaces de desencadenar una respuesta autoinmune ante la exposición a determinados factores ambientales <sup>(1)</sup>.

Esta asociación HLA con determinada enfermedad, cuando tiene un valor estadísticamente significativo, se considera como un factor de susceptibilidad o un marcador de riesgo a padecerla <sup>(32)</sup>. Esto puede cifrarse estadísticamente como “riesgo relativo” (RR) y se define como la fuerza de asociación de una enfermedad con la presencia de una característica (en nuestro caso, un alelo), un valor de RR superior a 1 indica asociación positiva, mientras que el RR inferior a 1 indica protección <sup>(39)</sup>. El RR da una idea de la probabilidad, dentro de un grupo de individuos que poseen el antígeno en cuestión, de que un sujeto presente la enfermedad o que esté protegido contra ella, si presenta dicho marcador o alelo HLA comparado con aquellos individuos que no lo poseen. <sup>(1)(32)</sup>

En general, las enfermedades asociadas a HLA comparten ciertas características, como la patogenia mayoritariamente desconocida, asociación con alteraciones inmunológicas, de naturaleza autoinmune, de incidencia familiar o que el gen de susceptibilidad sea de alta o débil penetrancia. Existen evidencias fehacientes de la estrecha relación entre la enfermedad y el rol de las moléculas de HLA que presentan tanto péptidos extraños como autoantígenos a linfocitos T auto-reactivos, activados por infinidad de causas como son: mimetismo molecular entre antígenos HLA y antígenos de agentes infecciosos, modificación de la estructura de los antígenos HLA, deficiencias en la respuesta inmune, deficiencias de los antígenos HLA clase III y falta de selección <sup>(39)(41)</sup>.

Hoy en día, se conocen diversas enfermedades que están asociadas a clase I, aunque en su mayoría son asociadas a clase II. Ejemplo de enfermedades asociadas a HLA se encuentran: espondilitis anquilosante, enfermedad de Reiter, uveitis anterior aguda para el equivalente serológico HLA-B27 con RR de 106, 40 y 20 respectivamente; artritis reumatoide, diabetes juvenil y pénfigo vulgar, para el serológico DR4 presentando un RR de 4, 6 y 15, respectivamente; en el caso del serológico DR3 está relacionado con diabetes juvenil, enfermedad celiaca, enfermedad de Grave, miastenia gravis, enfermedad de Addison, dermatitis herpetiforme, con RR de 3, 30, 4, 2, 5, y 17; enfermedad de Hodgkin para las

moléculas HLA-B35/-B18 con RR de 2.8; por mencionar los más importantes <sup>(32)</sup>  
<sup>(39)</sup> <sup>(41)</sup>.

### **3.7. Estudio poblacional de frecuencias alélicas y haplotípicas.**

#### **3.7.1. Descripción de frecuencias alélicas y haplotípicas**

Dos parámetros básicos en el estudio del comportamiento genético del sistema HLA dentro de las poblaciones son la frecuencia alélica y la frecuencia haplotípica. La frecuencia alélica es la medida de la abundancia de un alelo dentro de una población, es decir que representa la proporción de todos los alelos de un gen que son de un tipo específico en determinada población. En los organismos diploides, cada individuo contribuye con dos alelos por gen. Los homocigotos tienen dos copias de un mismo alelo, mientras que los heterocigotos tienen una copia de dos alelos diferentes <sup>(42)</sup>.

La frecuencia alélica también corresponde a la frecuencia relativa de un alelo (frecuencia absoluta/total de genes) en el genoma para un *locus* dado <sup>(43)</sup>.

Las frecuencias alélicas muestran variación poblacional, si bien algunos alelos son encontrados ampliamente distribuidos entre las poblaciones, otros por su parte se encuentran casi de forma exclusiva dentro de un grupo particular, este fenómeno ha sido estudiado en todo el mundo, incluido nuestro país <sup>(22)</sup> <sup>(44)</sup>. De tal forma que han sido relevantes en estudios antropogenéticos, en la diferenciación interpoblaciones e intrapoblaciones, permitiendo definir grupos étnicos específicos, grupos mestizos, distancias genéticas, rastreo de poblaciones y patrones de migración <sup>(45)</sup> <sup>(46)</sup> <sup>(47)</sup> <sup>(48)</sup> <sup>(49)</sup>. Un ejemplo de ello es el caso del alelo *HLA-B27* y los subtipos presentes en la población mexicana, de los cuales los más frecuentes han sido: B\*27:05 y B\*27:02, éste último se ha considerado heredado de la población española, dado que no ha sido reportado en poblaciones nativas americanas; e inclusive, podría suponerse que pueden ser resultado de una

mezcla reciente con alelos españoles, puesto que dichos subtipos se encuentran ausentes en la zona del centro y sur de América<sup>(43)</sup>.

Por otro lado, el haplotipo es una clase genética descrita por una secuencia de DNA o genes, o una combinación particular de alelos, que se encuentran cercanos físicamente en el mismo cromosoma. Originalmente este término es empleado para describir combinaciones de alelos del MHC. Los haplotipos son una poderosa herramienta para localizar genes de susceptibilidad a enfermedades complejas y comunes, así como para entender las propiedades funcionales de la variación ligada a haplotipos. La disponibilidad de un mapa de haplotipos del genoma humano ahora hace factible el desarrollar estudios de asociación genética del genoma completo. Estudios previos han demostrado que las frecuencias haplotípicas son características para poblaciones particulares e incluso, algunos son encontrados exclusivamente en determinados grupos poblacionales<sup>(28)</sup>. De hecho, las frecuencias haplotípicas así como el LD pueden proveer de mucha información, dado que ambos caracterizan la distribución de los genes HLA dentro de las poblaciones a lo ancho del mundo de una forma más clara<sup>(26) (50)</sup>. Las herramientas actuales para la determinación de haplotipos incluyen análisis de *pedigree* y métodos estadísticos para la estimación de haplotipos<sup>(28)</sup>. La caracterización de los haplotipos en una determinada población es una poderosa herramienta en la práctica clínica, en el caso de trasplantes, permite calcular la probabilidad de encontrar un donante en una población particular compatible para determinado receptor y estimar los tiempos de espera<sup>(51) (52) (53) (54)</sup>.

Finalmente, cabe mencionar que, como se ha descrito anteriormente, para el sistema genético HLA existen regiones conservadas de DNA. Estos bloques, que contienen a su vez combinaciones de alelos específicas en *loci* cercanos dentro de la región HLA, se ha observado que son compartidas por gran cantidad de individuos no relacionados de poblaciones humanas bien caracterizadas. Los largos segmentos de estas secuencias de DNA son conocidos como haplotipos extendidos conservados (*Conserved Extended Haplotypes*, CEHs), los cuales se han mantenido de generación en generación debido a una recombinación genética

relativamente ausente, por lo que también son objeto de interés en lo que respecta al estudio del sistema HLA <sup>(26) (27) (55)</sup>.

### 3.7.2. *Equilibrio de Hardy-Weinberg*

El equilibrio de Hardy-Weinberg (*Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE) es una herramienta importante para entender la estructura de una población. Sin embargo, antes de entrar en detalle, hay que entender que la transmisión del material genético de una generación a otra se analiza en términos de alelos en lugar de genotipos, dado que los genotipos son interrumpidos en cada generación por los procesos de segregación y recombinación; además, cuando los gametos se unen en la fertilización, es el momento en que son formados los genotipos de la siguiente generación, por lo que las frecuencias genotípicas en los cigotos de la prole, son determinadas por las frecuencias con las cuales los gametos parentales se unen, y estas frecuencias son a su vez, determinadas por la manera en que los genotipos se aparean. Por otro lado, en el apareamiento al azar, los pares unidos son formados sin considerar el genotipo. Este sistema de apareamiento es por mucho el más prevalente en la mayoría de las especies de animales y plantas, excepto en las plantas que se reproducen a través de la autofertilización. Cuando el apareamiento es al azar, cada tipo de par unido es formado tan frecuentemente como podría ser esperado a través de encuentros oportunos entre genotipos. El apareamiento al azar implica una relación simple entre la frecuencia alélica de una generación y la frecuencia genotípica en la siguiente generación, dado que el apareamiento al azar entre individuos es equivalente a la unión al azar de gametos <sup>(56)</sup>.

El proceso de apareamiento aleatorio no influye en las frecuencias alélicas. Así, la proporción de homocigotos y heterocigotos en cada nueva generación será la misma. Estas frecuencias constantes dan lugar a una distribución de equilibrio, la cual es denominada HWE y se define como la distribución estable de las

frecuencias de los genotipos:  $A/A$ ,  $A/a$  y  $a/a$  en las proporciones respectivas  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$ , (donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias de los alelos  $A$  y  $a$ ), que resultan del apareamiento al azar y de la ausencia de otras fuerzas evolutivas como mutación, migración, selección natural o deriva genética aleatoria <sup>(42)</sup>.

El principio del HWE se puede generalizar para incluir casos en los que hay más de dos alelos para un gen en la población. Comúnmente, sin importar el número de tipos alélicos que haya en la población, la frecuencia de homocigotos para un alelo particular es igual al cuadrado de la frecuencia del alelo. La frecuencia de heterocigotos para un par de alelos en particular es igual al doble del producto de la frecuencia de los dos alelos <sup>(56) (57)</sup>.

Una implicación importante en el principio del HWE es que las frecuencias alélicas permanecen constantes de generación en generación. Este principio depende de ciertos supuestos, entre los que destacan:

- La población es panmíctica, es decir que todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse, y dicho apareamiento es al azar (panmixia); no existen subpoblaciones que difieran en frecuencia alélica.
- Las frecuencias alélicas son las mismas en machos y hembras.
- Todos los genotipos son iguales en viabilidad y fertilidad (la selección no opera). Así mismo, las mutaciones no ocurren y la migración entre la población está ausente, por lo tanto, no hay ganancia ni pérdida de alelos.
- La población es lo suficientemente grande que las frecuencias alélicas no cambian de generación en generación solo por casualidad, además de que por su tamaño, se minimicen las diferencias existentes entre los individuos <sup>(56) (57)</sup>.

Desviaciones del HWE pueden ser debidas a endogamia, estratificación de la población o selección. También pueden ser síntoma de una asociación a enfermedad, cuyas consecuencias son a menudo insuficientemente exploradas <sup>(58)</sup>.

Otra implicación importante en el principio de Hardy-Weinberg es que, para alelos raros, las frecuencias de heterocigotos excede por mucho la frecuencia de los homocigotos raros<sup>(56)</sup>.

En otras palabras, la existencia de HWE en una población exige forzosamente que no exista evolución, lo cual es una condición irreal; entonces, ello nos podría llevar cuestionar el uso de dicha ley. Sin embargo, éste sirve para conocer la estructura del genoma, mediante el cálculo de las frecuencias relativas tanto de los alelos como de los genotipos en una población. Así mismo, sirve como hipótesis nula, considerando lo que debería suceder si no hay evolución y saber qué se observa en la población en caso contrario<sup>(59) (60)</sup>.

### ***3.8. Estudios de frecuencias alélicas y haplotípicas en México y su relación con otros grupos poblacionales***

#### *3.8.1. Panorama general del surgimiento de la diversidad genética en México.*

Hablar de mezcla génica e historia demográfica de México es complejo dado que en primer lugar, el componente indígena de nuestra población es resultado de la historia ancestral que comenzó desde las primeras migraciones de las tribus nómadas a través del estrecho de Bering al continente Americano, hace mas de 30 000 a 40 000 años, en el periodo paleolítico Asiático<sup>(23) (61) (62)</sup>. Posteriormente, acontecieron tres diferentes olas de migraciones así como cambios genéticos, por fuerzas evolutivas que dieron lugar a la conocida diversidad de poblaciones mesoamericanas, durante 1000 años antes de la Conquista. Para entonces, tenemos como poblaciones nativas más sobresalientes a los nahuas en el centro y norte de México; los mayas en el sureste de México, Honduras y Guatemala; los chibchas en Colombia; los incas en Perú y Chile, y los pueblos del sureste de Estados Unidos. Debido a estos antecedentes, nuestro país es considerado sobre todo de la afiliación de Asia, en contraste con los europeos y los africanos que

llegaron al continente americano como consecuencia de los viajes de Colón <sup>(63) (61)</sup>. Al tiempo de la Conquista en el siglo XVI, la población nativa que habitaba el país presentaba una gran variabilidad, y contaba con unos 20 millones de pobladores, que pertenecían a cientos de pueblos con distintos troncos lingüísticos <sup>(23)</sup>.

Por su parte, el componente europeo provino de España, principalmente de las regiones de Andalucía, León, Extremadura y las Castillas, de las cuales provenía poco más del 80% del ejército de Cortés, así como de Portugal y Génova. Sin embargo, debe ser enfatizado que el fondo genético introducido por los españoles, incluía a su vez, genes fenicios, griegos, romanos, visigodos, árabes y judíos, que prevalecían probable y evidentemente en las clases sociales inferiores, las cuales fueron los principales inmigrantes a América <sup>(23) (61) (64)</sup>.

El componente africano fue incorporado por la esclavitud procedente de la costa occidental de África (entre el río Senegal y la Angola Portuguesa, incluyendo Cabo Verde, Guinea y Congo), por lo tanto su influencia genética y cultural prevalece principalmente en las costas. Este componente fue introducido a la Nueva España desde la época colonial hasta 1817, año en el que se abolió el tráfico de esclavos desde África <sup>(23) (61) (65)</sup>.

Posteriormente, debido a las enfermedades y las guerras durante la conquista, se disminuyó en un 90% a la población aborigen, siendo sustituida por europeos, criollos, africanos, mulatos, y demás grupos humanos descendientes de los esclavos traídos de África <sup>(23) (66)</sup>. El gradiente de las diferentes características de las muchas tribus, así como la densidad demográfica desigual, fueron factores relevantes para el surgimiento de los mestizos en la época de la conquista española <sup>(61)</sup>.

Dados estos antecedentes, se puede definir genéticamente al mestizo mexicano como una persona que nació en México y es un descendiente de los habitantes nativos de dicha región, y de las personas, principalmente de origen europeo o africano, que inmigraron a América durante el siglo XVI <sup>(67) (68)</sup>.

Si bien el mestizo mexicano representa el 93% de la población total del país, se han encontrado contribuciones desiguales en el genoma a través de todo el territorio mexicano, de tal forma que el componente europeo predomina en la zona norte del país, mientras que el componente africano se localiza en las costas del sureste y algunas regiones del centro y gradientes de componente nativo americano desde el centro hacia las demás zonas del territorio nacional. Para el caso particular de la ciudad de México, el análisis basado en las frecuencias específicas para haplotipos nativos, ha demostrado la existencia de un 27% de componente amerindio, 14% de componente europeo, 4.9% africano y 58.2% de una mezcla de haplotipos mexicanos <sup>(26)</sup>.

### 3.8.2. *Situación demográfica actual de la población del valle de México*

El fenómeno migratorio es un hecho que también se debe considerar en estudios de la genética de las poblaciones. El Consejo Nacional de Población (CONAPO) define a la migración como el desplazamiento de personas que cambian su residencia habitual desde una unidad político-administrativa hacia otra, o que se mudan de un país a otro, en un periodo determinado. En México la migración ha sido un fenómeno determinante en la configuración actual del país. La creación y expansión de los principales centros urbanos fue resultado de la migración rural-urbana <sup>(69) (70)</sup>. Factores como las actividades económicas, la creación de ciudades, el abandono del campo, la destrucción de los ecosistemas y desastres naturales, búsqueda de mejor calidad de vida, de lugares para hacer estudios, búsqueda de mayor seguridad, entre otras razones, han provocado la migración de las poblaciones en el país, de tal forma que actualmente por ejemplo, un tercio de la población indígena de los países latinoamericanos vive en áreas urbanas, fenómeno similar al que se observa en la ZMVM <sup>(71) (23) (72)</sup>.

Si se toma en cuenta a la población indígena en particular, actualmente la ZMVM alberga a más de un millón de habitantes indígenas y por consecuencia de la

convivencia interétnica, esta misma zona ahora es un territorio heterogéneo y plurilingüe. Los descendientes de los grupos étnicos originarios del centro del país, conviven desde hace tiempo con otros grupos inmigrantes, que se han asentado en la zona urbana, así también, la ZMVM ha sufrido un proceso de etnización por extensión de la misma sobre los pueblos y comunidades indígenas circunvecinas. Por lo que, la creciente concentración de distintos grupos indígenas ha provocado un intenso intercambio genético y cultural, lo que ha convertido a la Ciudad de México en un crisol con la presencia de nahuas, purépechas, mazahuas, otomíes, zapotecos, mixtecos, triquis, entre otros <sup>(71)</sup> <sup>(73)</sup>. Ahora bien, todos ellos provienen principalmente de entidades cercanas al centro del país, entre las que destacan el Estado de Oaxaca con el 37.4% de la contribución de migrantes indígenas, seguido de manera un tanto lejana por Puebla (14.7%), Estado de México (12.6%), Hidalgo (10.8%) y Veracruz (9.7%). Estas cinco entidades federativas concentran el 85% de los miembros de pueblos indígenas que residen en el Distrito Federal pero que tienen un lugar de nacimiento distinto a éste <sup>(74)</sup> <sup>(73)</sup>. Adicionalmente, cabe resaltar que, de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el origen principal de los inmigrantes (tanto indígenas como mestizos) que llegan al Distrito Federal del 2005 al 2010 fue el Estado de México, mientras que éste último recibe inmigrantes provenientes mayoritariamente del Distrito Federal y los estados de Puebla, Hidalgo, Oaxaca y Morelos <sup>(72)</sup>. En el Distrito Federal, de acuerdo al censo del 2010, un 19.8% de su población proviene de otra entidad federativa o país; de la cual, las delegaciones en las que se concentra el mayor porcentaje de dicha población son Benito Juárez (23%), Cuauhtémoc (22.9%), Miguel Hidalgo (22.7%), Iztapalapa (21.5%) y Tlalpan (20.8%) <sup>(75)</sup>. Por su parte, de acuerdo al mismo censo, un 37.0% de la población del Estado de México nació en otra entidad federativa o país; los municipios mexiquenses con mayor porcentaje de población migrante son Coacalco de Berriozábal (58.9%), Nezahualcóyotl (58.4%), Chicoloapan (57.9%), Ixtapaluca (57.6%), Tecámac (56.7%), Ecatepec de Morelos (55.6%), Valle de Chalco Solidaridad (55.5%) y Tlalnepantla de Baz (53.0%) <sup>(76)</sup>.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.**

---

Desde su descubrimiento a principios del siglo pasado hasta la actualidad, la tipificación HLA ha sido de vital importancia, principalmente por su aplicación en la medicina de trasplantes y en la evaluación de la asociación HLA-enfermedad <sup>(77)</sup> <sup>(78)</sup> <sup>(79)</sup>. De forma general, se puede mencionar que entre los mecanismos que explican esta relación, se encuentran: el reconocimiento directo o indirecto que se lleva a cabo en el receptor de las moléculas HLA no compatibles del donante con la consiguiente estimulación de su respuesta inmune <sup>(80)</sup>; así también, el papel que pueden desempeñar determinadas especificidades HLA en la presentación de péptidos endógenos como etiología de enfermedades autoinmunes <sup>(81)</sup>.

De forma más específica, y enfocándonos al tema del presente trabajo, cabe resaltar los notables efectos favorables de la compatibilidad HLA del binomio receptor-donador en el trasplante renal, aspecto corroborado por numerosos investigadores, los cuales han demostrado que dicho binomio HLA compatible tiene un mejor pronóstico en la supervivencia del injerto que aquellos que no lo son.

Como podemos notar, dado el potencial de investigación y su trascendencia en el desarrollo de enfermedades, surge la necesidad de determinar las frecuencias alélicas y haplotípicas en la población mestiza mexicana, dado que ésta es resultado de una amplia mezcla de genes de origen nativo americano con genes del resto del mundo, dada la colonización sufrida tras el descubrimiento de América y las posteriores mezclas de la población de México con otro tipo de grupos humanos a lo largo de la historia. Para ello se recurrirá al estudio de una población abierta de pacientes en protocolo de trasplante renal así como a sus respectivos donadores sanos, los cuales fueron tipificados para el sistema HLA. Con las tipificaciones históricas, se creó una base de datos con las frecuencias alélicas y haplotípicas de dicha población.

La utilidad del conocimiento de las frecuencias alélicas de HLA en el diagnóstico molecular depende de su polimorfismo y de la heterocigocidad que presenta en una población específica. Establecer la magnitud de la heterogeneidad genética, las variantes y sus frecuencias en personas sanas de la población mestiza mexicana se ha vuelto indispensable para la aplicación en la clínica de áreas como la farmacogenética, para el estudio de problemas de autoinmunidad, para identificar oportunamente y con más precisión a los individuos susceptibles de desarrollar y transmitir enfermedades de origen genético y poder proporcionar un asesoramiento adecuado y establecer medidas preventivas. Estos estudios también sirven para la creación de bases de datos de donadores dentro de nuestra población, que hacen más eficiente la búsqueda de donantes para esta zona del país en lo particular -y posteriormente a nivel nacional- y mejoran los algoritmos de trasplante de órgano sólido para pacientes que se encuentran en lista de espera de donación cadavérica.

## 5. OBJETIVO

---

Analizar la diversidad biológica del sistema HLA en una muestra de la población de la ZMVM, a partir de datos de receptores y donadores del BCS de la UMAE-HE del CMN SXXI, con base en el estudio de las frecuencias alélicas y haplotípicas de dicho sistema.

### 5.1. *Objetivos particulares*

- ★ Determinar si existe diferencia significativa en las frecuencias alélicas y haplotípicas entre ambos grupos de receptores y donadores.
- ★ Determinar la ancestría y el origen poblacional de alelos, asociaciones y haplotipos presentes en esta población para comprender la vasta diversidad génica en los habitantes del valle de México en función de su historia social y demográfica.
- ★ Estudiar el equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra.
- ★ Comparar los datos obtenidos con estudios previamente realizados en esta población.
- ★ A partir de las frecuencias presentes en nuestra población en cuestión, obtener por consecuencia la probabilidad de encontrar individuos compatibles para el caso de trasplantes de médula ósea y órgano sólido en protocolos de donación cadavérica.
- ★ Dar a conocer las frecuencias de alelos de interés clínico dentro de la población de la ZMVM, en particular alelos que participan en enfermedades autoinmunes así como alelos de interés para el área de farmacogenética.
- ★ Explorar la creación de bases de datos para donadores potenciales.

## 6. HIPÓTESIS.

---

- ★ Las frecuencias alélicas y haplotípicas para la muestra poblacional de la ZMVM serán concordantes a lo reportado previamente en la literatura.
- ★ Las frecuencias alélicas de los donadores y receptores no diferirán significativamente entre sí.
- ★ Se encontrarán alelos, asociaciones y haplotipos originarios de las poblaciones parentales históricas para la población mestiza mexicana.
- ★ Dada la historia natural del sistema, no se cumplirá el equilibrio de Hardy-Weinberg para al menos uno de los cuatro genes analizados en la muestra.

## **7. DISEÑO METODOLÓGICO**

---

La estructura de investigación de la presente tesis se enfocó en un estudio basado en un diseño no experimental ya que no se modifica la variable a estudiar, de tal forma que las frecuencias alélicas y haplotípicas se obtuvieron por el estudio de los alelos y haplotipos presentes en la muestra y que sucedieron en su contexto natural. En cuanto a la dimensión temporal del estudio se llevó a cabo un diseño transversal, lo que implica que la recolección de datos se realizó en un solo corte de tiempo; y es un estudio descriptivo dado que se estudiaron las incidencias y los valores en que se manifestaron dichas frecuencias. Para explicar las relaciones en el tiempo de tipo causa-efecto para las frecuencias a estudiar, el estudio se realizó mediante un diseño retrospectivo o histórico, en el cual los datos a analizar se dieron en la realidad y fueron obtenidos a partir de los antecedentes registrados.

### **7.1. Muestra**

El estudio fue realizado a partir de una muestra de pacientes que acudieron al BCS de la UMAE-HE del CMN SXXI durante los años 2005 a 2011.

El total de pacientes registrados inicialmente en la base de datos fue de 2820 individuos. La población en estudio incluyó tanto receptores de trasplante renal como sus respectivos donadores, así como pacientes en lista de espera de trasplante de donador fallecido.

Tras la depuración exhaustiva de pacientes a los que se les comprobó un origen distinto a la ZMVM, así como donadores relacionados genéticamente con sus receptores, se obtuvo finalmente una base de datos que incluía los haplotipos de 1994 individuos no relacionados entre sí, con los cuales se realizó el presente trabajo.

## **7.2. Tipificación del sistema HLA en el laboratorio de Histocompatibilidad**

El alto grado de polimorfismo del sistema HLA requiere del desarrollo de técnicas que puedan resolver las múltiples diferencias alélicas y que sea compatible con el uso rutinario en laboratorios que realizan determinaciones de HLA.

En la práctica clínica, se solicita a los laboratorios proveer de la tipificación alélica a diversos niveles de resolución de acuerdo a la situación clínica. La tipificación a alta resolución se requiere para trasplantes de médula ósea mientras que la tipificación a baja resolución o serológica es suficiente para el estudio de la compatibilidad para un trasplante renal. <sup>(22)</sup>

La amplificación de fragmentos de DNA mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) confiere un alto grado de sensibilidad al genotipaje HLA. Los métodos más difundidos que utilizan la PCR incluyen la amplificación de DNA seguida de la hibridación con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSOP) y la amplificación de DNA con *primers* de secuencia específica (PCR-SSP). <sup>(82) (83)</sup>

### **7.2.1. Obtención de la muestra de DNA.**

La muestra de DNA se aísla a partir de una muestra de sangre total recolectada en tubos con EDTA o ACD como anticoagulante.

La extracción de DNA se realizó con el kit *DNA Isolation Kit for Mammalian Blood Roche*<sup>®</sup> (*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Alemania) la cual se basa en el uso de sales y detergentes para la lisis celular. Inicialmente se eliminan los eritrocitos por lisis, mediante un choque hipotónico. Posteriormente se lisan los leucocitos por medio de detergentes no iónicos como el SDS, para obtener al DNA

en solución, se prosigue a precipitar y eliminar proteínas. Posteriormente, el DNA se precipita y purifica mediante extracciones con etanol absoluto y etanol al 70% respectivamente. Finalmente, se disuelve el DNA en 100µl de agua estéril.

Dependiendo de la muestra, el DNA obtenido mediante esta técnica posee una relación de las absorbancias 260/280 entre 1.8 y 2.0 y una concentración mayor a 100 ng/µl, ambos parámetros se cuantifican por espectrofotometría UV.

#### 7.2.2. *Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando Oligonucleótidos de Secuencia Específica (PCR-SSOP)*

La técnica de PCR-SSOP es el método de elección para laboratorios que realizan un gran número de tipificaciones, pero por su resolución obtenida (baja a mediana), solo es recomendable aplicarla para estudios de HLA en trasplante de órganos sólidos.

La técnica PCR-SSO, llamada también hibridación reversa, SSO reversa, *dot blot* reversa, emplea primers seleccionados de una región conservada localizados en el exón de un *locus* particular, lo que le da selectividad a la amplificación. Los *primers* son marcados con una molécula ligante, como la biotina. Éstos son empleados en una mezcla de reacción que incorpora el DNA de paciente y que posteriormente se procede a amplificar. El DNA amplificado del paciente se une mediante hibridación, a las tiras de membrana de nitrocelulosa que contienen las sondas de oligonucleótidos inmovilizadas, seguido por un lavado con un buffer astringente para remover el producto amplificado que no se unió a las sondas; la marca en el DNA hibridado es convertida en una reacción de color empleando el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano y un sustrato apropiado, y finalmente se procede a analizar e interpretar los resultados, lo cual se basa en el patrón de diferenciación. Debido al gran número de sondas utilizadas en la tipificación de PCR-SSO, el análisis es asistido por un programa de computación.

Las tipificaciones realizadas mediante ésta técnica tanto para HLA clase I (HLA-A y -B) como para clase II (HLA-DRB1 y -DQB1) se realizaron con los reactivos del SSO HLA Typing Kit, Dynal RELI<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU).

### 7.2.3. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando Primers de Secuencia Específica (PCR-SSP)

La técnica PCR-SSP consiste en el montaje de diversas reacciones de PCR para cada *locus*, empleándose en cada una de ellas un conjunto de *primers* o cebadores, en número variable, cuyas secuencias discriminan las diferentes variantes que puede presentar el *locus*, de forma tal que sólo se produce reacción de amplificación cuando el DNA contiene el alelo que corresponde al grupo de *primers* de la reacción particular. <sup>(35) (84) (85)</sup>

Para la tipificación de HLA por éste método, se preparó la mezcla de reacción con el DNA del paciente (a una concentración de 75-125 ng/μl) junto con la *Taq* DNA polimerasa y medio de reacción. Posteriormente se procede a verter dicha mezcla a la placa de reacción que contiene los múltiples *primers* diseñados para alinearse dentro de las regiones de DNA presentes en ciertos alelos o grupos de alelos durante la amplificación. Si los alelos correspondientes están presentes en la muestra, la presencia de sus correspondientes productos amplificados puede ser detectada mediante un gel de electroforesis. La interpretación de los resultados y asignación de alelos, así como la resolución de ambigüedades, se llevó a cabo a través del uso de las tablas de especificidad correspondientes para cada kit.

Las tipificaciones para *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* y *-DQB1* fueron realizadas con el reactivo HLA-A/B/DR/DQ SSP Unitray<sup>®</sup> (*PeI-Freez*, Brown Deer, Wisconsin, EEUU; *Invitrogen*, Carlsbad, California, EEUU) de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

### 7.3. *Parámetros estadísticos*

El análisis inicial de la muestra consistió en realizar una prueba de comparación de dos proporciones, ésta es aplicada en diseños de investigación en los que se estudia a dos grupos de individuos a quienes se ha medido una variable cualitativa que, medida en ambos grupos, se puede resumir en forma de proporciones. Al comparar dichas proporciones se busca averiguar si existe diferencia estadísticamente significativa entre ellas. Para el presente estudio, dicha prueba se realizó para determinar si existía diferencia significativa entre receptores que padecen insuficiencia renal y donadores sanos.

En la prueba se plantean las siguientes hipótesis estadísticas:

**Hipótesis nula:**  $H_0: p_1 = p_2$

**Hipótesis alterna:**  $H_a: p_1 \neq p_2$

Donde:

$p_1$ : proporción de interés calculada en el primer grupo, en este caso la frecuencia para cada alelo presentado por los receptores que padecen insuficiencia renal.

$p_2$ : proporción de interés calculada en el segundo grupo, en este caso la frecuencia para cada alelo presentado por los donadores, los cuales son individuos sanos.

El procedimiento de la prueba incluye la determinación del valor de  $z$  *calculado*. El rechazo de  $H_0$  ocurre cuando el valor  $z$  calculado con los datos, resulta mayor que el valor crítico de dicha medida que está contenido en la tabla de áreas bajo la curva normal. El área conjunta de las regiones de rechazo, equivale a un nivel de significancia de 0.05, de tal forma que los valores críticos que habría que rebasar para caer en una u otra región de rechazo serían por un lado -1.96 y por otro lado +1.96. En el caso de que se haya podido rechazar a la  $H_0$ , se dice que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas proporciones<sup>(86)</sup>.

### 7.3.1. *Estimación de frecuencias alélicas y haplotípicas de los genes HLA-A, -B, -DRB1 y -DQB1.*

Las frecuencias alélicas y haplotípicas de HLA se obtuvieron por conteo directo de genes con el software *Arlequin* v.3.0 <sup>(87)</sup>. Así mismo, la proporción de los haplotipos específicos de nativos americanos, europeos, africanos y mestizos mexicanos en nuestra muestra fue calculada basándose en las frecuencias étnico-específicas de los haplotipos *HLA-A/-B/-DRB1/-DQB1* en las poblaciones parentales.

Se consideró para el presente estudio una división continental de las poblaciones con el fin de facilitar su estudio. Ésta división se basó en la localización geográfica de dichas poblaciones y su cercanía con otras poblaciones que permitiera la interacción entre ellas. En particular se dividió al continente Americano en: Norteamérica (desde Alaska, EEUU hasta Guadalajara y la Región Huasteca de México), Centroamérica (desde la Ciudad de México, hasta Panamá) y Sudamérica (desde Colombia hasta Argentina). Se dividió al continente Europeo en Europa Occidental y Europa Oriental, ésta última comprende los países: Albania, Armenia, Azerbaijón, Bielorrusia, Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Croacia, Eslovaquia, Eslovenia, Estonia, Georgia, Hungría, Kazajistán, Letonia, Lituania, Macedonia, Moldavia, Montenegro, Polonia, República Checa, Rumania, Rusia, Serbia y Ucrania). En la zona de Medio Oriente se consideraron a los países: Arabia, Baréin, Catar, Chipre, Emiratos Árabes Unidos, Egipto, Irak, Irán, Israel, Jordania, Kuwait, Líbano, Omán, Palestina, Siria, Turquía y Yemen. África se dividió en África Septentrional o Sahariana, incluyendo a Argelia, Libia, Marruecos, Sahara Occidental y Túnez, mientras que el resto de los países del continente se consideraron como África Subsahariana. En cuanto a los países pertenecientes a los continentes de Asia y Oceanía se consideraron de acuerdo a la división geográfica y política de los mismos.

En lo correspondiente a la Zona Metropolitana del Valle de México, se consideraron a los pacientes que habitan el Distrito Federal y municipios conurbados del Estado de México y que fueron remitidos a la UMAE-HE del CMN SXXI.

### 7.3.2. *Estudio del LD y Delta' ( $\Delta'$ )*

El LD será crucial para el diseño de estudios de asociaciones hasta que la secuenciación del genoma completo esté disponible rutinariamente. Si un polimorfismo causal de una enfermedad no se encuentra aún genotipado, aún se pueden lograr detectar sus efectos a través de su LD con los polimorfismos ya tipificados. Para evaluar el poder de los diseños de estudios de asociaciones, es necesario medir el LD. Sin embargo al ser el LD un fenómeno no cuantitativo no existe una escala natural para medirlo. Entre las medidas que se han propuesto para datos de haplotipos de dos locus, se encuentra  $\Delta'$  como una de las más importantes, la cual corresponde al valor de LD estandarizado.  $\Delta'$  es sensible incluso a pocas recombinaciones entre los *loci* desde la mutación más reciente en uno de ellos. En la literatura, se destaca la disminución exponencial con el tiempo de  $\Delta'$  entre *loci* ligados en modelos simples de genética de poblaciones, pero los efectos estocásticos sugieren que esta relación teórica es de utilidad limitada<sup>(58)</sup>. En el presente estudio, el valor de  $\Delta'$  se obtuvo con el software *Arlequin* v.3.0<sup>(87)</sup>.

### 7.3.3. *Estadístico t*

Una herramienta empleada para sustentar estadísticamente el valor de  $\Delta'$ , fue el estadístico t, el cual corrobora los resultados obtenidos determinando si existe significancia estadística en las asociaciones de alelos por LD, por lo que este parámetro se utilizó como filtro para evitar que algún resultado de LD entre los pares de alelos señalados por el software fuera debido al azar. De tal forma que

los resultados del  $\Delta'$  eran estadísticamente significativos cuando el valor absoluto de t era mayor a 2<sup>(88)</sup>.

#### 7.3.4. *Cálculo del HWE.*

El cálculo del HWE se realizó mediante el software *Arlequin* v.3.0<sup>(87)</sup> con al menos dos réplicas, cada una de ellas con 1 001 000 de pasos realizados.

## 8. RESULTADOS

**Tabla 1:** Frecuencias de los grupos de alelos de los genes *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* y *-DQB1* en la muestra analizada del Valle de México

<i>HLA-A</i>	<i>n</i>	<i>F.a.</i>	<i>HLA-B</i>	<i>n</i>	<i>F.a.</i>	<i>HLA-DRB1</i>	<i>n</i>	<i>F.a.</i>	<i>HLA-DQB1</i>	<i>n</i>	<i>F.a.</i>
A*01	98	0.0494	B*07	65	0.0326	DRB1*01	112	0.0562	DQB1*02	186	0.0933
A*02	675	0.3388	B*08	52	0.0261	DRB1*01:03	7	0.0035	DQB1*03:01	419	0.2101
A*03	75	0.0376	B*13	17	0.0083	DRB1*03:01	86	0.0434	DQB1*03:02	613	0.3074
A*11	55	0.0276	B*14:01	13	0.0065	DRB1*03:02	7	0.0035	DQB1*03:03	25	0.0125
A*23	35	0.0178	B*14:02	55	0.0276	DRB1*04	645	0.3237	DQB1*04	389	0.1951
A*24	334	0.1675	B*14:03	1	0.0003	DRB1*07	108	0.0542	DQB1*05	185	0.0930
A*25	10	0.0050	B*14:04	1	0.0003	DRB1*08	368	0.1843	DQB1*06	177	0.0885
A*26	41	0.0208	B*15:01	136	0.0685	DRB1*09	10	0.0050			
A*29	54	0.0271	B*15:02	9	0.0043	DRB1*10	20	0.0100			
A*30	62	0.0311	B*15:03	9	0.0048	DRB1*11	88	0.0444			
A*31	149	0.0747	B*15:10	9	0.0048	DRB1*12	11	0.0053			
A*32	25	0.0128	B*15:11	1	0.0008	DRB1*13	123	0.0617			
A*33	41	0.0203	B*15:15	1	0.0003	DRB1*14	217	0.1086			
A*34	5	0.0023	B*15:16	1	0.0008	DRB1*15	96	0.0479			
A*36	4	0.0020	B*15:17	5	0.0023	DRB1*16	96	0.0484			
A*66	7	0.0035	B*15:31	1	0.0003						
A*68	312	0.1562	B*15:36	1	0.0003						
A*69	3	0.0013	B*15:54	1	0.0003						
A*74	7	0.0038	B*15:69	1	0.0003						
A*80	1	0.0005	B*15:98	1	0.0005						
			B*18	53	0.0266						
			B*27	26	0.0130						
			B*35	412	0.2066						
			B*37	7	0.0035						
			B*38	27	0.0135						
			B*39	356	0.1785						
			B*40:01	19	0.0098						
			B*40:02	155	0.0777						
			B*40:05	10	0.0050						
			B*40:08	1	0.0003						
			B*40:10	1	0.0003						
			B*40:11	1	0.0003						
			B*40:20	1	0.0003						
			B*40:27	1	0.0003						
			B*40:71	1	0.0003						
			B*41	21	0.0103						

B*42	5	0.0028
B*44	101	0.0507
B*45	23	0.0118
B*46	1	0.0005
B*47	1	0.0005
B*48	88	0.0439
B*49	37	0.0186
B*50	23	0.0113
B*51	103	0.0517
B*52	55	0.0273
B*53	25	0.0128
B*54	1	0.0003
B*55	11	0.0055
B*56	5	0.0028
B*57	27	0.0135
B*58	13	0.0065
B*73	1	0.0005
B*78	3	0.0015
B*81	5	0.0023

---

**Tabla 2: Haplotipos más frecuentes de la población del Valle de México.**

Haplotipo				N	F.h.	Previamente reportado en: Población, Frecuencia (Referencia)
A*02	B*39	DRB1*04	DQB1*03:02	76	0.0384	Sioux Dakota del Sur, EUA. 0.051 (89); teenek Región Huasteca México. 0.037 (90); mestizos Sinaloa, México. 0.018 (26); mestizos Ciudad de México. 0.029 (26); mestizos Puebla, México. 0.025 (26); mazatecos, Oaxaca México. 0.149 (91); mayas, Guatemala. 0.042 (92); yucpa, Sierra de Perija Venezuela. 0.257 (93);
A*02	B*35	DRB1*08	DQB1*04	68	0.0339	Yupiks, Alaska EUA. 0.031 (94); sioux Dakota del Sur, EUA. 0.014 (89); tarahumaras, Chihuahua México. 0.034 (95); mestizos Ciudad de México. 0.012 (26); mestizos Puebla, México. 0.030 (26); nahuas, Morelos México. 0.061 (96); mayas, Guatemala. 0.084 (92); uros, Lago Titicaca Perú. 0.168 (97); quechuas, Cuzco Perú 0.065 (98); aymaras, Bolivia 0.104 (99)
A*68	B*39	DRB1*04	DQB1*03:02	56	0.0283	Teenek Región Huasteca México. 0.052 (90); mestizos Ciudad de México. 0.025 (26); mayas, Guatemala. 0.064 (92); yucpa, Sierra de Perija Venezuela. 0.349 (93)
A*02	B*35	DRB1*04	DQB1*03:02	50	0.0251	Teenek Región Huasteca México. 0.155 (90); nahuas, Morelos México, 0.020 (96); Mazatecos, Oaxaca México. 0.025 (91); mayas, Guatemala. 0.106 (92); uros, Lago Titicaca Perú. 0.063 (97).
A*24	B*39	DRB1*04	DQB1*03:02	39	0.0196	Mestizos Sinaloa, México. 0.027 (26); mazatecos, Oaxaca México. 0.033 (91); yucpa, Sierra de Perija Venezuela. 0.093 (93); aleuts Isla de Bering, Rusia. 0.042 (100).
A*24	B*39	DRB1*14	DQB1*03:01	37	0.0183	Nahuas, Morelos México. 0.054 (96).
A*24	B*35	DRB1*04	DQB1*03:02	31	0.0153	Sioux Dakota del Sur, EUA. 0.065 (89); teenek Región Huasteca México. 0.037 (90); mestizos Ciudad de México. 0.017 (26); mestizos Puebla, México. 0.015 (26); mazatecos, Oaxaca México. 0.025 (91); mayas, Guatemala. 0.050 (92); yucpa, Sierra de Perija Venezuela. 0.012 (93); quechuas, Cuzco Perú, 0.014 (98); aymaras, Bolivia 0.031 (99).
A*02	B*15:01	DRB1*08	DQB1*04	27	0.0138	Mestizos Puebla, México. 0.015 (26).
A*02	B*40:02	DRB1*04	DQB1*03:02	27	0.0133	Mestizos Ciudad de México. 0.012 (26); aymaras, Bolivia 0.023 (99).
A*02	B*15:01	DRB1*04	DQB1*03:02	27	0.0133	Mestizos Sinaloa, México. 0.018 (26); mestizos Puebla, México. 0.015 (26); irlandeses, Irlanda del Sur. 0.010 (101); murcianos, España. 0.016 (102)
A*31	B*35	DRB1*08	DQB1*04	23	0.0115	Mestizos Ciudad de México. 0.012 (26)
A*02	B*39	DRB1*08	DQB1*04	22	0.0110	Sioux Dakota del Sur, EUA. 0.022 (89); aymaras, Bolivia 0.034 (99).
A*02	B*51	DRB1*04	DQB1*03:02	21	0.0108	Sioux Dakota del Sur, EUA. 0.014 (89)
A*68	B*35	DRB1*04	DQB1*03:02	21	0.0108	Mestizos Puebla, México. 0.020 (26); nahuas, Morelos México, 0.020 (96); mayas, Guatemala. 0.023 (92); uros, Lago Titicaca Perú. 0.055 (97); aymaras, Bolivia 0.039 (99).
A*68	B*40:02	DRB1*04	DQB1*03:02	21	0.0105	Yupiks, Alaska EUA. 0.021 (94); mestizos Sinaloa, México. 0.018 (26); teenek Región Huasteca México 0.029 (103); terenas, Mato Grosso do Sul Brasil (104); aleuts Isla de Bering, Rusia. 0.028 (100); eskimos, Siberia (105).
A*02	B*35	DRB1*16	DQB1*0301	21	0.0103	Teenek Región Huasteca México. 0.029 (90)
A*24	B*35	DRB1*08	DQB1*04	21	0.0103	Yupiks, Alaska EUA. 0.060 (94); mayas, Guatemala. 0.042 (92); uros, Lago Titicaca Perú. 0.068 (97); lamas, Ciudad Lamas, Perú. 0.024 (106); aymaras, Bolivia 0.031 (99).

**Tabla 3** Desequilibrios más frecuentes entre los alelos *HLA-A* y *-B* en la población mestiza del Valle de México.

Desequilibrio		N	F.h.	$\Delta'$	t	Previamente reportado en: Región geográfica (Frecuencia; Referencia)
A*02	B*35	170	0.0853	0.1117	4	Norteamérica (0.014-0.184; (89) (90) (94) (95) (107)); centroamérica (0.012-0.220; (26) (91) (92) (48) (49) (108) (109)); sudamérica (0.011-0.231; (97) (99) (106) (48) (49) (110) (111)); Europa occidental (0.010-0.050; (112) (113) (114)); Europa oriental y medio oriente (0.010-0.075; (48) (49) (115) (116) (117)); África septentrional (0.013; (118)); África subsahariana (0.022-0.054; (119) (120)); Asia (0.016-0.079; (121) (122) (123) (124) (125)).
A*02	B*39	136	0.0680	0.0633	2	Norteamérica (0.018-0.087; (89) (90) (26)); centroamérica (0.019-0.220; (26) (91) (92) (108) (126)); sudamérica (0.013-0.269; (93) (111) (99) (106)); Europa occidental (0.010-0.011; (112)); Asia (0.015-0.021; (127)).
A*02	B*15:01	135	0.0676	0.2355	5	Norteamérica (0.017-0.018; (26) (107)); centroamérica (0.024-0.030; (26) (48) (49)); Europa occidental (0.010-0.066; (101) (112) (128) (129) (130) (131) (132)); Asia (0.014-0.043 (100); (133) (134)).
A*02	B*51	106	0.0531	0.2659	5	Norteamérica (0.018-0.034; (89) (26) (95) (107)); centroamérica (0.014-0.030; (26) (48) (49) (108)); sudamérica (0.011-0.050; (99) (48) (49) (110) (111) (135)); Europa occidental (0.010-0.065; (112) (128) (129) (132) (136) (137) (138)); Europa oriental y medio oriente (0.026-0.099; (48) (49) (116) (139) (140) (141) (142)); África septentrional (0.010-0.045; (118) (143) (144) (145)); África subsahariana (0.013-0.046; (119) (120) (146)); Asia (0.020-0.144; (100) (121) (122) (123) (125) (147) (148)).
A*24	B*39	94	0.0469	0.1234	6	Norteamérica (0.015-0.027; (26) (107)); centroamérica (0.030-0.033; (91) (108)); sudamérica (0.015-0.093; (93) (48) (49) (110) (111)); Europa oriental (0.013; (141)); África septentrional (0.012; (144)); Asia (0.019-0.455; (100) (125) (147) (148)).
A*68	B*39	88	0.0439	0.1246	6	Norteamérica (0.052; (90)); centroamérica (0.014-0.064; (26) (92) (48) (49)); sudamérica (0.015-0.349; (93) (111)); Asia (0.028; (100)).
A*24	B*35	82	0.0409	0.0471	2	Norteamérica (0.018-0.117; (89) (26) (94) (95) (103) (107)); centroamérica (0.024-0.092; (26) (91) (92) (48) (49) (108) (126)); sudamérica (0.016-0.116; (93) (97) (99) (106) (48) (49)); Europa occidental (0.010-0.034; (101) (112) (113) (114) (131) (132) (136) (149) (150)); Europa oriental y medio oriente (0.012-0.057; (139) (140) (141) (151) (152)); África septentrional (0.011; (118)); Asia (0.014-0.384; (122) (123) (127) (134) (147) (148) (153) (154) (155) (156) (157) (158) (159)).
A*02	B*52	57	0.0286	0.2785	3	Norteamérica (0.015-0.037; (90) (107)); centroamérica (0.024; (48) (49)); sudamérica (0.058; (93)); Europa oriental y medio oriente (0.014-0.027; (48) (49) (116)); Asia (0.026-0.118; (134) (160)).
A*31	B*35	52	0.0258	0.1752	5	Norteamérica (0.015-0.041; (89) (107)); centroamérica (0.024-0.026; (26) (92)); sudamérica (0.030; (111)); Europa occidental (0.011-0.013; (112) (113) (132)); Asia (0.200; (134)).
A*68	B*40:02	41	0.0206	0.1284	4	Norteamérica (0.018-0.068; (26) (94)); Europa occidental (0.010; (112)); Asia (0.056; (100)).
A*24	B*40:02	39	0.0193	0.0972	3	Norteamérica (0.015-0.368; (94) (95) (107)); centroamérica (0.020-0.040; (26) (108)); sudamérica (0.011; (48) (49)); Europa occidental (0.010; (131)); Asia (0.021-0.154; (100) (127) (147)).
A*29	B*44	29	0.0143	0.5026	7	Norteamérica (0.015; (107)); centroamérica (0.015-0.038;

						(48) (49) (109) (126)); sudamérica (0.014-0.017; (48) (49) (111) (135)); Europa occidental (0.010-0.100; (101) (102) (112) (113) (114) (128) (129) (130) (132) (136) (137) (149) (161) (162) (163) (164)); África septentrional (0.029-0.060; (143) (165) (166)); África subsahariana (0.011-0.046; (48) (49) (120) (167)).
A*01	B*08	28	0.0140	0.5145	7	Centroamérica (0.012-0.043; (26) (48) (49) (109) (126)); sudamérica (0.016-0.032; (48) (49) (110) (111) (135)); Europa occidental (0.010-0.372; (101) (102) (112) (113) (114) (128) (129) (130) (131) (132) (136) (137) (138) (149) (150) (161) (162) (163) (164) (168) (169)); Europa oriental y medio oriente (0.010-0.049; (48) (49) (139) (140) (141) (142) (170)); África subsahariana (0.028-0.071; (120)); Asia (0.034-0.110; (100) (125) (171)).
A*30	B*18	27	0.0135	0.2308	5	Norteamérica (0.019; (107)); centroamérica (0.012-0.029; (48) (49) (126) (109)); sudamérica (0.010-0.013; (48) (49) (111)); Europa occidental (0.011-0.125; (102) (112) (114) (132) (137) (164)); África septentrional (0.015-0.050; (143) (145)); África subsahariana (0.036-0.040; (119) (120)).
A*68	B*48	26	0.0128	0.1602	4	No reportado previamente.

**Tabla 4** Desequilibrios más frecuentes entre los alelos *HLA-B* y *-DRB1* en la población mestiza del Valle de México.

Desequilibrio		N	F.h.	$\Delta'$	t	Previamente reportado en: Región geográfica (Frecuencia; Referencia)
B*39	DRB1*04	191	0.0955	0.3126	10	Norteamérica (0.045-0.117; (89) (90) (26)); centroamérica (0.019-0.182; (26) (91) (92) (108) (126)); sudamérica (0.013-0.699; (93) (111)); Asia (0.010-0.064; (100) (147)).
B*35	DRB1*08	135	0.0675	0.2009	9	Norteamérica (0.014-0.168; (89) (94) (95)); centroamérica (0.024-0.190; (26) (92) (108)); sudamérica (0.015-0.236; (97) (99) (106) (111)); Europa occidental (0.010-0.017; (112) (131)); Asia (0.037-0.083; (100) (172)).
B*40:02	DRB1*04	82	0.0409	0.2988	6	Norteamérica (0.018-0.093; (26) (94)); centroamérica (0.012-0.040; (26) (108)); Europa Occidental (0.010-0.013; (131) (132)); Asia (0.011-0.029; (100) (147)).
B*39	DRB1*14	75	0.0374	0.2016	7	Centroamérica (0.060; (108)); sudamérica (0.036; (106)); Asia (0.010-0.098; (127)).
B*15:01	DRB1*08	55	0.0273	0.2635	7	Centroamérica (0.015; (26)); Europa occidental (0.015-0.018; (131)); Asia (0.029-0.037; (147)).
B*35	DRB1*16	45	0.0226	0.3273	6	Norteamérica (0.029; (103)); centroamérica (0.015-0.100; (26) (108)); sudamérica (0.070; (93)); Europa occidental (0.010-0.015; (112) (150)); medio oriente (0.076; (117)).
B*48	DRB1*04	41	0.0203	0.2057	3	Norteamérica (0.171; (94)); sudamérica (0.015-0.126; (97) (106) (111)); Asia (0.029-0.186; (100) (147)).
B*44	DRB1*07	40	0.0201	0.3615	9	Norteamérica (0.014; (89)); centroamérica (0.015-0.114; (92) (109) (126)); sudamérica (0.014-0.032; (111) (135)); Europa occidental (0.010-0.096; (101) (102) (112) (128) (129) (130) (131) (132) (136) (149) (161) (162) (163) (164)); Europa oriental y medio oriente (0.012-0.013; (141) (152)); África septentrional (0.012-0.070; (118) (143) (144) (173)); África subsahariana (0.016; (119)); Asia (0.018-0.122; (100) (121) (122) (123) (124) (125) (154) (158) (159) (172) (174) (175)).
B*40:02	DRB1*08	38	0.0188	0.0707	2	Norteamérica (0.034; (95)); Europa occidental (0.021; (131)); Asia (0.025-0.028; (100) (160)).
B*14:02	DRB1*01	38	0.0188	0.6629	9	Norteamérica (0.018; (26)); centroamérica (0.012; (26)); sudamérica (0.030; (111)); Europa occidental (0.014-0.054; (112) (132) (136)); África septentrional (0.040; (143)); África subsahariana (0.016; (119)); Asia (0.060; (175)).
B*07	DRB1*15	32	0.0158	0.4587	8	Norteamérica (0.014; (89)); centroamérica (0.019-0.038; (109) (126)); sudamérica (0.014-0.040; (111)); Europa occidental (0.011-0.267; (101) (102) (112) (128) (129) (130) (131) (132) (136) (138) (149) (161) (162) (163) (164) (168) (169)); África septentrional (0.018-0.023; (118) (144)); África subsahariana (0.032; (119)); Asia (0.020-0.165; (100) (125) (148) (159) (172)).
B*08	DRB1*03:01	28	0.0140	0.5175	7	Centroamérica (0.012-0.032; (26) (109)); Europa occidental (0.011-0.349; (101) (102) (112) (128) (129) (130) (131) (132) (136) (150) (162) (163) (164) (168) (169)); Europa oriental y medio oriente (0.011-0.049; (115) (142)); África septentrional (0.012-0.043; (143) (144) (173)); Asia (0.020; (148)).
B*48	DRB1*08	28	0.0138	0.1594	3	Norteamérica (0.034-0.070; (94) (95)); centroamérica (0.030; (108)); sudamérica (0.052-0.078; (99) (106)); Asia (0.010; (147)).
B*39	DRB1*16	25	0.0123	0.0917	2	Norteamérica (0.014; (89)); centroamérica (0.025-0.160; (26) (91) (108)); sudamérica (0.012-0.015; (93) (111)); Europa occidental (0.010; (112)); Asia (0.023-0.037; (125) (148) (176)).
B*40:02	DRB1*14	23	0.0113	0.0410	2	Norteamérica (0.034-0.249; (94) (95)); centroamérica (0.030; (108)); Europa occidental (0.011; (112)); Asia (0.010-0.097; (100) (127)).
B*18	DRB1*03:01	22	0.0108	0.3787	6	Centroamérica (0.012; (109)); Europa occidental (0.010-0.082; (101) (102) (112) (132) (164)); África septentrional (0.012-0.020; (143) (144) (145)); África subsahariana (0.024; (119)).

**Tabla 5** Desequilibrios más frecuentes entre los alelos *HLA-DRB1* y *-DQB1* en la población mestiza del Valle de México.

Desequilibrio	N	F.H.	$\Delta'$	t	Previamente reportado en: Región geográfica (Frecuencia; Referencia)	
DRB1*04	DQB1*03:02	605	0.3032	0.9795	60	Norteamérica (0.051-0.375; (89) (90) (94) (95) (61) (177) (178)); centroamérica (0.095-0.353; (26) (92) (91) (108)); sudamérica (0.093-0.711; (93) (97) (99) (106) (179) (180)); Europa occidental (0.015-0.170; (101) (102) (131) (162) (164) (181) (182) (183) (184) (185)); Europa oriental y medio oriente (0.010-0.148; (141) (142) (152) (170) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194)); África septentrional (0.025-0.110; (143) (145) (165) (166) (173) (195) (196) (197) (198)); África subsahariana (0.050-0.090; (199)); Asia (0.010-0.203; (100) (105) (121) (174) (200) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (207) (208) (209) (210) (211) (212) (213) (214) (215) (216) (217) (24) (218)); Oceanía (0.015-0.172; (203) (219)).
DRB1*08	DQB1*04	354	0.1773	0.9527	34	Norteamérica (0.038-0.586; (89) (94) (95) (61) (177) (178)); centroamérica (0.024-0.280; (26) (92) (108) (126)); sudamérica (0.010-0.236; (93) (97) (99) (106) (179) (180)); Europa occidental (0.016-0.254; (131) (181) (184) (185)); Europa oriental y medio oriente (0.010-0.077; (141) (186) (191) (193) (194) (220)); África septentrional (0.010-0.024; (196) (197)); África subsahariana (0.026; (221)); Asia (0.014-0.153; (100) (105) (172) (200) (201) (202) (207) (208) (211) (212) (218)); Oceanía (0.017; (203)).
DRB1*14	DQB1*03:01	184	0.0923	0.8099	21	Norteamérica (0.029-0.455; (89) (90) (94) (95) (61) (177) (178)); centroamérica (0.105-0.142; (108)); sudamérica (0.046-0.377; (93) (97) (99) (106) (179) (180)); Asia (0.011-0.255; (105) (160) (200) (202) (206) (207) (208) (211) (212) (216) (217)); Oceanía (0.017; (203)).
DRB1*01	DQB1*05	110	0.0549	0.9754	16	Norteamérica (0.018-0.084; (26) (61) (178)) centroamérica (0.012-0.090; (26) (108) (109) (126)); Europa occidental (0.011-0.171; (101) (102) (131) (149) (150) (162) (163) (169) (181) (182) (183) (184) (185)); Europa oriental y medio oriente (0.010-0.228; (170) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194) (220) (222)); África septentrional (0.010-0.260; (143) (145) (195) (196) (197) (198)); África subsahariana (0.014-0.150; (167) (199) (221) (223) (224)); Asia (0.010-0.175; (100) (105) (121) (122) (123) (172) (174) (200) (201) (202) (204) (205) (206) (207) (208) (210) (211) (212) (216) (217) (218) (225)); Oceanía (0.036; (219)).
DRB1*07	DQB1*02	88	0.0441	0.7958	14	Norteamérica (0.014-0.074; (89) (61) (177) (178)); centroamérica (0.015-0.139; (92) (108) (109)); Europa occidental (0.020-0.146; (101) (102) (131) (149) (162) (163) (164) (169) (181) (182) (183) (184) (185)); Europa oriental y medio oriente (0.012-0.247; (141) (151) (152) (170) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194) (220) (222)); África septentrional (0.020-0.427; (118) (143) (144) (145) (165) (166) (173) (195) (196) (197) (198)); África subsahariana (0.044-0.435; (167) (199) (221) (223) (224)); Asia (0.010-0.220; (100) (121) (122) (123) (154) (159) (172) (174) (200) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (209) (210) (214) (216) (24) (218) (225) (226) (227) (228)); Oceanía (0.077; (219)).
DRB1*15	DQB1*06	88	0.0441	0.9138	14	Norteamérica (0.018-0.053; (26) (61)); centroamérica (0.038; (109)); Europa occidental (0.011-0.480; (101) (102) (131) (149) (162) (163) (164) (181) (182) (183) (184) (185) (229)); Europa oriental y medio oriente (0.017-0.170; (142) (169) (186) (187) (190) (191) (192) (193) (194) (220) (222)); África septentrional (0.012-0.120; (118) (143) (144) (145) (173) (196) (197) (198)); África subsahariana (0.015-0.341; (167) (199) (221) (223) (224) (230)); Asia (0.012-0.358; (100) (105) (121) (122) (123) (157) (159) (172) (174) (200) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (207)

						(208) (209) (210) (211) (212) (213) (214) (215) (216) (217) (24) (218) (225) (226) (227) (228)); Oceanía (0.120-0.261; (203) (213) (219)).
DRB1*16	DQB1*03:01	85	0.0426	0.8491	13	Norteamérica (0.043-0.084; (89) (90) (94) (61)); centroamérica (0.017-0.298; (26) (91) (108)); sudamérica (0.015-0.257; (93) (179) (180)); Asia (0.050; (105)); Oceanía (0.014; (203)).
DRB1*03:01	DQB1*02	84	0.0421	0.9681	14	Norteamérica (0.014-0.114; (89) (61) (177)); centroamérica (0.012-0.044; (26) (109)); Europa occidental (0.011-0.507; (101) (102) (131) (150) (162) (163) (164) (169) (181) (182) (183) (184)); Europa oriental y medio oriente (0.027-0.220; (142) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (220) (222)); África septentrional (0.015-0.270; (143) (144) (145) (165) (166) (173) (195) (196) (197) (198)); África subsahariana (0.063-0.187; (167) (199) (221) (223)); Asia (0.012-0.234; (121) (154) (159) (174) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (209) (210) (214) (215) (216) (24) (223) (225) (226) (227) (228) (231) (232)); Oceanía (0.114; (219)).
DRB1*11	DQB1*03:01	78	0.0389	0.8426	13	Norteamérica (0.014-0.182; (89) (26) (94) (61) (178)); centroamérica (0.019; (108)); sudamérica (0.018; (106)); Europa occidental (0.010-0.515; (131) (150) (162) (169) (181) (182) (183) (184) (185)); Europa oriental y medio oriente (0.029-0.300; (152) (141) (142) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194) (220) (222)); Asia (0.010-0.188; (105) (121) (122) (123) (160) (172) (205) (200) (201) (202) (203) (206) (207) (208) (209) (210) (211) (212) (213) (216) (24) (218) (225) (227) (228) (232)); Oceanía (0.083-0.578; (203) (213)).
DRB1*13	DQB1*06	74	0.0369	0.5585	12	Norteamérica (0.020-0.032; (61)); centroamérica (0.023-0.170; (108) (109) (126)); Europa occidental (0.010-0.207; (101) (102) (131) (149) (162) (164) (169) (181) (182) (183) (184) (185)); Europa oriental y medio oriente (0.010-0.220; (140) (141) (186) (187) (190) (191) (192) (193) (194) (220) (222)); África septentrional (0.010-0.165; (118) (143) (145) (173) (195) (196) (197) (198)); África subsahariana (0.034-0.239; (167) (199) (221) (223) (224) (230)); Asia (0.010-0.235; (121) (122) (123) (154) (174) (200) (201) (202) (203) (205) (206) (207) (208) (209) (210) (211) (212) (214) (216) (24) (218) (226) (227) (228)); Oceanía (0.042; (219)).
DRB1*13	DQB1*03:01	36	0.0181	0.1045	3	Norteamérica (0.010; (61)); sudamérica (0.036; (106)); Europa occidental (0.011-0.038; (183) (184) (185)); Europa oriental y medio oriente (0.010-0.076; (186) (187) (189) (190) (192) (193) (194)); África septentrional (0.019-0.109; (143) (165) (166) (196) (197) (198)); África subsahariana (0.020-0.030; (167) (199) (230)); Asia (0.010-0.050; (105) (201) (202) (203) (214) (215) (218)).
DRB1*14	DQB1*05	27	0.0133	0.0385	2	Norteamérica (0.010-0.169; (94) (61) (177)); centroamérica (0.012-0.049; (108)); Europa occidental (0.013-0.259; (131) (181) (182) (183) (184) (185) (229)); Europa oriental y medio oriente (0.010-0.079; (140) (141) (186) (187) (190) (191) (193) (220) (222)); África septentrional (0.010-0.025; (143) (195) (197) (198)); África subsahariana (0.010-0.032; (167) (199) (221) (223)); Asia (0.010-0.633; (100) (105) (121) (122) (123) (160) (200) (201) (202) (203) (205) (206) (207) (208) (210) (211) (212) (213) (214) (215) (216) (217) (24) (218) (226) (227) (231) (232)); Oceanía (0.086-0.265; (203) (213) (219)).
DRB1*10	DQB1*05	20	0.0100	1.0000	6	Centroamérica (0.035; (108)); Europa occidental (0.010-0.043; (131) (183) (184) (185) (229)); Europa oriental y medio oriente (0.014-0.072; (186) (187) (189) (190) (194)); África septentrional (0.010-0.065; (143) (173) (195) (196) (197) (198)); África subsahariana (0.012-0.088; (167) (199) (221) (223)); Asia (0.011-0.081; (121) (122) (123) (154) (157) (174) (193) (202) (203) (204) (205) (206) (210) (214) (215) (24) (218) (225)).

**Tabla 6.** Equilibrio de Hardy-Weinberg

<b>Locus</b>	<b>Heterocigosidad observada</b>	<b>Heterocigosidad esperada</b>	<b>Valor de P</b>
<i>HLA-A</i>	0.79488	0.81969	<b>0.00606</b>
<i>HLA-B</i>	0.88917	0.90199	<b>0.04370</b>
<i>HLA-DRB1</i>	0.81745	0.83110	0.08476
<i>HLA-DQB1</i>	0.78034	0.79813	0.12334

## 9. DISCUSIÓN

---

### 9.1. Diversidad

Dentro de la muestra analizada de pacientes que acudieron al BCS UMAE-HE CMN SXXI, se encontró que para los grupos de alelos *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* y *-DQB1*, existe una amplia diversidad de ellos, como se puede observar en la Tabla 1 los alelos encontrados más frecuentemente (en orden decreciente) son: *HLA-A*: A\*02, A\*24, A\*68, A\*31 y A\*01, con frecuencias de 0.3388, 0.1675, 0.1562, 0.0747 y 0.0494 respectivamente; *HLA-B*: B\*35, B\*39, B\*40:02, B\*15:01 y B\*51 con las correspondientes frecuencias 0.2066, 0.1785, 0.0777, 0.0685 y 0.0517; *HLA-DRB1*: DRB1\*04, DRB1\*08, DRB1\*14, DRB1\*13 y DRB1\*01, obteniéndose frecuencias de 0.3237, 0.1843, 0.1086, 0.0617 y 0.0562 respectivamente y *HLA-DQB1*: DQB1\*03:02, DQB1\*03:01 y DQB1\*04 con sus frecuencias 0.3074, 0.2101 y 0.1951.

Los alelos más frecuentes estudiados en el párrafo anterior representan el 78.66% de la variabilidad en *HLA-A*, el 58.3% de la variabilidad en *HLA-B*, el 73.45% de la variabilidad en *HLA-DRB1* y el 71.26% de la variabilidad en *HLA-DQB1* dentro de nuestra población.

Cabe aclarar que para el análisis de los alelos HLA, así como para el resto de los análisis realizados en la presente tesis, se emplearon resultados tanto de receptores como de donadores de trasplante renal y receptores en protocolo de donador cadavérico sin distinción alguna, dado que no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa para cada uno de los alelos de los 4 genes analizados, entre ambos tipos de sujetos, tanto individuos sanos o con insuficiencia renal (datos no mostrados).

Sin embargo, cabe mencionar que a pesar de la vasta diversidad encontrada, hubieron 5 polimorfismos que no se encontraron en la muestra y que se han reportado en otras poblaciones, tales grupos son: A\*43, B\*59, B\*67, B\*82 y B\*83,

cuya información se detalla a continuación: el grupo A\*43 se ha estudiado en la población zulú de Sudáfrica <sup>(48)</sup> <sup>(49)</sup>, con una frecuencia de 0.014, y es posible que éste no se encuentre en nuestra población dado que la principal fuente de esclavos durante la Conquista se localizaba en la zona de África septentrional y África central, de tal forma que la población zulú no fue fuente de esclavos a la Nueva España en aquella época <sup>(23)</sup> <sup>(65)</sup> o por el hecho de haber sufrido una dispersión temprana en el planeta y que en algún momento pudo haberse extinguido por enfermedades, las cuales presentan una alta incidencia en esa región del continente africano. Por otra parte, el grupo B\*59 se ha encontrado en estudios diferentes en las poblaciones de Curitiba en Paraná Brasil, con una frecuencia de 0.060 <sup>(111)</sup>, en Corea del Sur con frecuencias entre 0.071 y 0.010 <sup>(121)</sup> <sup>(174)</sup>, y en el centro de Japón, con frecuencia de 0.027 <sup>(211)</sup>.

En el caso del grupo B\*67, se ha presentado en poblaciones orientales, tales como los Hakka de Taiwan, que lo presentan en una frecuencia de 0.054 <sup>(133)</sup>, pobladores del centro de Japón, con frecuencia de 0.011 <sup>(211)</sup> y habitantes del sur de Portugal, con frecuencia de 0.010 <sup>(112)</sup>, por lo que podría considerarse como un grupo propio de la población del este Asiático y con la cual no se ha tenido contacto previo con ella o que dicho alelo permaneció en Asia y no migró a América durante el paso de las poblaciones a través del estrecho de Bering.

Para el grupo B\*82 solo se ha encontrado en la población de Luo en Kenia con frecuencia de 0.028 <sup>(120)</sup>, y que pudo haber sufrido el mismo fenómeno que el grupo A\*43 y haber sufrido una dispersión temprana en el mundo pero que se extinguió posteriormente por alguna enfermedad que haya atacado a la población que lo portaba.

Finalmente, no se han encontrado haplotipos del grupo B\*83 en ninguna población en el mundo, y sólo se ha reportado en pigmeos mbenzele de la República Centroafricana <sup>(233)</sup>.

Otra razón de estudiar a los alelos por separado se debe a que desde hace varias décadas se sabe que el padecimiento de ciertas enfermedades se asocia con el incremento en la frecuencia de un determinado alelo HLA.

## 9.2. Haplotipos

Para el caso del estudio de haplotipos presentes en la muestra analizada, se consideraron sólo los haplotipos con frecuencia mayor a 0.010 (Tabla 2). Se encontró que éstos son predominantemente de origen nativo-americano, siendo solo un haplotipo producto de la contribución europea, de acuerdo a lo reportado previamente.

Todos los haplotipos presentes exclusivamente en poblaciones nativas del norte, centro y sur de América, indicarían ser producto de al menos dos olas de migración al continente desde el noreste de Asia a través del Estrecho de Bering hace 15 000 - 18 000 años; este origen se fundamenta en la presencia de alelos compartidos entre poblaciones del este de Asia y grupos humanos nativos de América <sup>(23)</sup>.

Para el caso de los haplotipos *HLA-A\*02/-B\*15:01/-DRB1\*08/-DQB1\*04* y *HLA-A\*31/-B\*35/-DRB1\*08/-DQB1\*04*, no se puede determinar la ascendencia, puesto que solo están presentes en el mundo en población mestiza de Puebla y de la ciudad de México, respectivamente; por lo tanto se podría afirmar que dichos haplotipos son propios de la población del Valle de México como resultado del mestizaje a través de los siglos.

El único haplotipo que además de encontrarse en mestizos mexicanos se encontró en Europa es *HLA-A\*02/-B\*15:01/-DRB1\*04/-DQB1\*03:02*, lo cual indica ascendencia de esta región del mundo a partir de las inmigraciones realizadas durante la conquista y colonia en nuestro país.

Otros haplotipos interesantes y que se discutirán mas a detalle en el siguiente apartado son: *HLA-A\*68/-B\*40:02/-DRB1\*04/-DQB1\*03:02* y el cual se encontró en los aleuts de la Isla de Bering en Rusia y en eskimos de Siberia, lo cual señala la migración temprana de dichos alelos por el noreste del continente Asiático hacia el norte del continente Americano; mientras que el haplotipo *HLA-A\*02/-B\*40:02/-DRB1\*04/-DQB1\*03:02* se ha encontrado también en los aymaras de Bolivia.

### **9.3. Desequilibrios de ligamiento**

Se mencionó anteriormente que la población del Valle de México posee una gran diversidad de alelos HLA; sin embargo, el estudio de alelos de forma individual no provee la mejor aproximación estadística que indique la frecuencia real dentro de la población, dado que dichos alelos forman parte de un conjunto. No obstante, al observar los haplotipos que incluyen los alelos más estudiados en el campo médico, podemos observar un sesgo en la información, puesto que como se mencionó anteriormente la mayor parte de estos son asociaciones muy conservadas pertenecientes a grupos nativos del continente o incluso propios exclusivamente de poblaciones mexicanas, tanto puras como mestizas, y arrojan la presencia de sólo un haplotipo europeo, por lo que para un estudio más detallado de la diversidad, orígenes y pormenores del mestizaje en el Valle de México, se estudiaron también los desequilibrios de ligamiento entre pares de alelos.

Para el desequilibrio entre alelos de clase I, se encontró que los alelos *HLA-A\*02/-B\*39*; *HLA-A\*02/-B\*15:01*; *HLA-A\*68/-B\*39*; *HLA-A\*31/-B\*35*; se hallan predominantemente en los continentes asiático y americano, lo cual sugiere que dichos desequilibrios proceden de una migración tardía al continente americano y que posteriormente se conservaron en dicho continente a través del tiempo, en el caso particular de los desequilibrios *HLA-A\*68/-B\*40:02*; *HLA-A\*24/-B\*40:02*; se puede observar que el primer desequilibrio únicamente se localiza en

Norteamérica, y el segundo sí es posible encontrarlo distribuido hasta Sudamérica aunque en una frecuencia muy baja, indicando también una posible migración tardía desde el norte del continente hacia el Valle de México, en donde los grupos humanos se establecieron por 200 años pero la migración hacia regiones al sur del Valle de México se vio truncada por la llegada de los españoles, de tal forma que dichos alelos no pudieron extenderse hasta el sur del continente.

Otros desequilibrios de interés son *HLA-A\*24/-B\*39* y *HLA-A\*02/-B\*52* los cuales se han reportado en poblaciones de Europa Oriental y Medio Oriente, así como África Septentrional, por lo que indicaría un posible origen musulmán de dichos alelos, y que dada la invasión musulmana a Europa, pudieron haber llegado a nuestro continente a través de los españoles<sup>(48) (49) (116) (141) (144)</sup>.

Por otra parte, también se encontró el desequilibrio *HLA-A\*01/-B\*08* de posible origen europeo, dado que se ha encontrado reportado a través de todo el continente en frecuencias significativas. Mientras que la asociación *HLA-A\*30/-B\*18* posee de igual forma un origen europeo pero dirigido a la zona mediterránea, ya que a su vez se encontró en África septentrional y África subsahariana<sup>(101) (102) (112) (113) (114) (119) (120) (128) (129) (130) (131) (132) (136) (137) (138) (143) (145) (149) (150) (161) (162) (163) (164) (168) (169)</sup>.

Es importante resaltar el hecho de que como resultado del análisis de una muestra de la población del Valle de México se encontró el desequilibrio *HLA-A\*68/-B\*48* el cual no se ha reportado previamente en ningún grupo poblacional del mundo, por lo que se puede sugerir que dicha asociación es propia de mestizos mexicanos del centro del país y que el presente trabajo es el primero en reportarlo con una frecuencia mayor a 0.010.

Finalmente, cabe aclarar que en las asociaciones restantes no es posible determinar un origen de manera directa puesto que se encontraron en frecuencias altas en diversas poblaciones de todo el mundo, lo que podría implicar que han acompañado a la especie humana desde sus orígenes hasta nuestros días.

La Tabla 4 es por mucho la que mayor información provee al presente estudio, debido a que incluye a los alelos *HLA-B* de clase I y los alelos *HLA-DRB1* de clase II, ambos con gran polimorfismo y que al analizar su desequilibrio se convierten en un punto de enlace entre ambos tipos de moléculas, sin la restricción que nos producían *HLA-A* y *HLA-DQB1*, como sucede en la Tabla 2 de haplotipos.

Para dichas asociaciones, se encontraron en su mayoría de origen nativo americano, procedentes de Asia y que llegaron a nuestro continente por las migraciones a través del estrecho de Bering. Ejemplo de ello son los desequilibrios: *HLA-B\*39/-DRB1\*04* y *HLA-B\*35/-DRB1\*08*, estos casos en particular resalta el hecho de que, de acuerdo con lo reportado anteriormente (véanse referencias en la Tabla 4), durante el poblamiento del continente se vieron favorecidos e incrementando conforme se avanza hacia los territorios del sur del mismo. Tal vez debido a que conferían cierto tipo de resistencia a algún patógeno y por lo tanto se seleccionaron positivamente en los grupos poblacionales.

Otro ejemplo de desequilibrios de origen nativo americano son: *HLA-B\*39/-DRB1\*14*; *HLA-B\*48/-DRB1\*04*; *HLA-B\*48/-DRB1\*08*; *HLA-B\*39/-DRB1\*16*; en todos estos dichas asociaciones se encontraron de la misma manera que lo anteriormente mencionado, observándose el mismo patrón de migración a partir del continente Asiático hacia América y que se preservaron presuntamente durante ese proceso. *HLA-B\*40:02/-DRB1\*04*; *HLA-B\*40:02/-DRB1\*08*; *HLA-B\*40:02/-DRB1\*14*, son casos particulares en los que se demuestra que el alelo *HLA-B\*40:02* es común en las poblaciones de Norteamérica y es un claro ejemplo de alelo fundador, y no solo eso, sino también es interesante señalar el hecho de que se encontrara también en poblaciones de Europa, y más específicamente en los Samis de Suecia, lo que sugiere un posible contacto entre las poblaciones del círculo polar Ártico, respaldado por el hecho de que geográficamente es una zona muy cercana, y es razonable pensar que dichas poblaciones tuvieron contacto entre ellas. Muestra de ello es que, además se encontraron otros desequilibrios

con posible origen euroasiático, estos son: *HLA-B\*15:01-DRB1\*08* y *HLA-B\*44-DRB1\*07*.

Como era de suponerse, también se encontraron asociaciones de origen europeo, tal es el caso de *HLA-B\*07-DRB1\*15*; *HLA-B\*18-DRB1\*03:01*; *HLA-B\*08-DRB1\*03:01*; este último pertenece específicamente a la zona mediterránea.

Para los desequilibrios encontrados entre *HLA-DRB1* y *-DQB1* de la tabla 5, se observa que gran parte de ellos se encuentra en poblaciones de todo el mundo, esto se explica debido al hecho de que dentro de la región de clase II, dichos alelos se encuentran muy cercanos, por lo cual es poco probable que suceda algún tipo de recombinación entre ellos al momento de la meiosis, de tal manera que dicho bloque se conserva aún más frecuentemente que en el caso de las moléculas de clase I o entre regiones I y II, que se encuentran aún más separadas dentro de la región del MHC en el cromosoma.

Sin embargo, podemos notar dos desequilibrios propios de poblaciones nativas americanas: *HLA-DRB1\*14-DQB1\*03:01* y *HLA-DRB1\*16-DQB1\*03:01*, así como una asociación de origen euroasiática *HLA-DRB1\*14-DQB1\*05*.

Actualmente los desequilibrios de ligamiento que se estudian en los laboratorios de histocompatibilidad en el país, tanto públicos como del sector privado, son de origen caucásico, y dada la cantidad de pacientes analizados en el presente estudio, los resultados obtenidos reflejan la realidad del comportamiento de los alelos del sistema HLA en el centro del país, presentándose éste trabajo como un marco de referencia en el conocimiento de la población del Valle de México.

#### **9.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg.**

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg muestra que no existen desviaciones estadísticamente significativas en la población para HLA clase II (tabla 6); Sin embargo, se observó que la heterocigocidad esperada para la clase I (*HLA-A* y

*HLA-B*) es mayor a la observada ( $p < 0,05$  para ambos casos). Esto puede deberse a los sendos procesos migratorios que ocurren en nuestra ciudad, en particular la recepción de habitantes indígenas de otras partes del país <sup>(71)</sup>. Otra razón por la que clase I no se encuentra en equilibrio, podría deberse a procesos de selección sobre estas regiones genómicas en cada caso, por patógenos contra los cuales su respuesta se encuentra relacionada directamente con la presentación de antígenos, es decir, virus y bacterias intracelulares.

Estudios de asociación gen-patógeno-morbilidad deberán realizarse para poder confirmar tales hipótesis, pero se debe tener en mente que algunas asociaciones entre genes HLA y enfermedades infecciosas ya se han llevado a cabo y muestran tanto protección como predisposición a padecer enfermedades como la lepra (*HLA-DR/-DQ*) de origen bacteriano o la infección por HIV <sup>(234)</sup>.

## 10. CONCLUSIONES

---

La diversidad biológica encontrada para el sistema HLA es extensa e incluye casi en su totalidad a todos los grupos alélicos de dicho sistema; a su vez para los alelos más frecuentes, la variabilidad representada por éstos corresponde a más del 70% para los genes *HLA-A*, *-DRB1* y *-DQB1* y casi el 60% de la variabilidad en *HLA-B*, dentro de la población en estudio.

No existe diferencia significativa entre las frecuencias alélicas y haplotípicas presentadas por receptores y donadores, por lo que el padecer insuficiencia renal no se encuentra relacionada con los alelos HLA.

Los alelos encontrados del sistema HLA para ambas clases presentaron una considerable variabilidad de éstos en la población de la ZMVM, puesto que sólo cinco del total de polimorfismos reportados y pertenecientes a HLA clase I, no se encontraron en la población.

Se encontró que los haplotipos más frecuentes en la población mestiza de la ZMVM son aquellos reportados previamente en grupos indígenas de América, con lo que se demuestra que la ancestría nativa americana es la más importante en la Ciudad de México, seguida por la representada por los haplotipos propios de la población mestiza mexicana, y sólo un representante de haplotipo europeo.

El estudio del desequilibrio de ligamiento mostró una mayor diversidad en los orígenes del acervo genético mexicano (en cuanto a la asociación entre los alelos).

El equilibrio de Hardy-Weinberg no se cumple para los alelos *HLA-A* y *-B*.

## 11. PERSPECTIVAS

---

El presente trabajo representa un esfuerzo exhaustivo en el estudio de la genética de poblaciones aplicada a HLA en la población mestiza mexicana perteneciente a la ZMVM, y lo convierte en un referente en el estudio de la frecuencia alélica y haplotípica del sistema HLA, así como en el estudio del origen o ancestría de éste en nuestro país. No obstante aún quedan muchas interrogantes en las que hay que profundizar para un mayor entendimiento de lo anteriormente concluido.

En primer lugar, se debería plantear un estudio más detallado de la muestra con fenotipos de moléculas del MHC en las células. Lo que se encontraría, de acuerdo al reporte anual 2011 de la *Bone Marrow Donors Worldwide* (BMDW), es una amplia diversidad de fenotipos, de hecho dicho reporte indica que México ocupa el tercer lugar en fenotipos únicos HLA-A/-B/-DR en células madre recopiladas en la base de datos de la BMDW (debajo de Sudáfrica y la India) y el segundo en fenotipos únicos HLA-A/-B/-DR en unidades de sangre de cordón umbilical (sólo después de Tailandia), en el entendido de que un fenotipo único es aquel que sólo se ha presentado en un donador dentro de la base de datos de la BMDW<sup>(235)</sup>, lo que podría significar una mala noticia para pacientes con haplotipos únicos, puesto que resultaría más difícil encontrar un donador HLA idéntico dentro de la población y se limitarían buscar donadores haploidénticos, lo que afectaría la sobrevivencia del trasplante que, en el caso de órgano sólido, disminuiría.

De igual forma queda la interrogante acerca de por qué los alelos HLA clase I no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que invita a realizar, en primera instancia, un estudio detallado de la homocigocidad (coeficiente de endogamia) para los alelos *HLA-A* y *-B*, para determinar cuáles son las especificidades que contribuyen en mayor medida a esa homocigocidad. A partir de ello, quedan por realizar estudios de asociación gen-patógeno-morbilidad para determinar la razón por la cual se ven favorecidos determinados alelos con respecto a otros,

establecer si se debe por algún proceso de selección, y explicar a su vez el hecho de que el HWE sí se cumple para clase II.

Con base en el análisis genético-poblacional de frecuencias alélicas y haplotípicas, se puede incursionar en la construcción de bases de datos y bancos de donación para optimizar la búsqueda de donantes de órganos, tejidos o células necesarios en caso de un alotrasplante, a nivel local para esta zona del país en lo particular -y posteriormente extenderlo a nivel nacional- y mejorar a su vez los algoritmos de trasplante de órgano sólido para pacientes que se encuentran en espera de donación cadavérica. Se debe aplicar el conocimiento de las frecuencias alélicas y haplotípicas de la ZMVM como la probabilidad de encontrar dentro de nuestra población a donadores con determinados alelos y haplotipos necesarios para quien requiere un trasplante, lo que hace más probable encontrar un haplotipo que ha presentado mayor frecuencia en dicha población. Así también, el estudio de las frecuencias alélicas y haplotípicas podría ser útil para realizar consideraciones estratégicas en caso de no encontrarse donadores compatibles cuando existen pacientes que presentan alelos HLA poco frecuentes.

Derivado de lo anterior, también se propone la prueba cruzada virtual [*virtual* PRA (vPRA)] que correlaciona el porcentaje de especificidades (obtenidas por análisis del HLA-PRA, *HLA-Panel Reactive Antibodies*) contra las cuales el paciente presenta anticuerpos reactivos y las frecuencias de los alelos ante los cuales muestra reactividad dentro de la población a la que pertenece el paciente. Esto perfeccionaría la búsqueda de mejores candidatos, con valores de vPRA menores, a recibir un trasplante de cadáver o donador no relacionado, perteneciente a su misma localidad; debido a que la probabilidad de rechazo del injerto es menor a comparación de los individuos sensibilizados a un mayor número de antígenos HLA<sup>(23)</sup>.

En el caso de la población mestiza del Valle de México, el encontrar alelos de susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, como es el caso del HLA-B\*27 asociado a espondilitis anquilosante, uveítis y artritis reactiva, o el caso de HLA-B\*51 asociado a la enfermedad de Behçet, revela el posible desarrollo de la

enfermedad a la cual están asociados o incluso la presencia de la misma, por lo que son los presentes resultados un punto de apoyo para la estimación de la cantidad de pacientes que podrían acudir a las unidades de salud y pronosticar la cantidad de recursos destinados al diagnóstico oportuno, prevención, control y tratamiento de dichas enfermedades, así como la capacitación pertinente y adecuada del personal de salud correspondiente.

Por otra parte, la tipificación de HLA revela rasgos polimórficos que son vistos como marcadores de susceptibilidad o resistencia a una enfermedad o infección y que ponen de manifiesto la inmunidad de nuestra población a partir del conocimiento de las frecuencias alélicas y haplotípicas, de tal forma que se tenga previsto el cómo proceder ante una contingencia sanitaria que ponga en riesgo a nuestra población.

De aquí que también sea importante la divulgación de trabajos como el presente, enfocados hacia el personal de salud, ya que el desconocimiento del sistema HLA, su función y su aplicación clínica, influye negativamente en los tratamientos a pacientes y la pronta recuperación de su salud, lo que merma su calidad de vida.

Adicionalmente, el sistema HLA representa un modelo de desarrollo de la medicina predictiva y preventiva, debido al descubrimiento de efectos secundarios a la medicación producidos por sales de oro, penicilamina D, tiopronina, entre otros, que han sido relacionados recientemente a alelos o haplotipos particulares de HLA; por lo que hasta la actualidad, se han estudiado un gran número de fármacos que desencadenan reacciones adversas dependientes a HLA, los más representativos son: la hipersensibilidad debida a la interacción entre el abacavir y el *HLA-B\*57:01*, la necrosis epidérmica inducida por carbamazepina ligada a *HLA-B\*15:02* y la reacción adversa cutánea a alopurinol asociada a *HLA-B\*58:01*, razón por la que se ha vuelto indispensable la tipificación de HLA antes de comenzar el tratamiento con dichos fármacos<sup>(236)</sup>. Por consecuencia, el presente trabajo tiene aplicación en estudios en el área de farmacogenética, en donde se presta atención los diversos alelos de interés clínico, para brindar a los pacientes

tratamiento personalizado, así como para estratificar el riesgo de hipersensibilidad a fármacos de acuerdo a los alelos HLA predominantes en nuestra población.

Todo esto conduce a proponer a largo plazo, el desarrollo de políticas públicas en beneficio de los pacientes, de acuerdo a como su enfermedad lo requiera, ya sea en el trasplante de órgano sólido, de HSC, enfermedades autoinmunes asociadas a HLA, posibles reacciones adversas a medicamentos, etc. Así, solo resta para el sistema HLA, concederle su debida importancia y apoyar el crecimiento de todas estas incipientes perspectivas, de tal forma que se logre consolidar como una herramienta indispensable, a la vanguardia de la medicina.

## 12. REFERENCIAS

---

1. *A short history of HLA*. **Thorsby, Erik**. 2009, Tissue Antigens, Vol. 74, pp. 101-116.
2. **García García, Manuel**. Alogénico. *Diccionario Médico*. [Online] Diciembre 27, 2011. [Cited: Enero 29, 2012.] [http://www.portalesmedicos.com/diccionario\\_medico/index.php/Alogenico](http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Alogenico).
3. **Brandan N, Aquino J, Fortuny L**. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. *Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina. Cátedra de Bioquímica*. [Online] Noviembre 2006. [Cited: Diciembre 2, 2011.] <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>.
4. **Rodey, Gleen E**. *HLA Beyond Tears. Introduction to Human Histocompatibility*. E.U.A. : De Novo Inc., 2000. pp. 1-39.
5. **Abbas, Abul K., Lichtman, Andrew H. and Pillai, Shiv**. *Inmunología Celular y Molecular*. Sexta edición. Barcelona : Elsevier España, 2008. pp. 97-136,375-396.
6. *The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications*. **Choo, Sung Yoon**. 1, s.l. : Yonsei Medical Journal, 2007, Vol. 48, pp. 11-23.
7. *Serotyping of human lymphocyte antigens. III. Long term kidney homograft survivors*. **Vredevoe DL, Terasaki PI, Mickey MR, Glassock R, Merrill JP, Murray JE**. [ed.] van Rood JJ. Amos DB. Copenhagen: Munksgaard. : Histocompatibility Testing., 1965, pp. 25–35.
8. *Human transplantation antigens*. **Kissmeyer-Nielsen F, Thorsby E**. s.l. : Transplant Rev, 1970, Vol. 4, pp. 1–176.
9. *Studies on artificial antigens. III. The genetic control of the immune response to hapten poly-L-lysine conjugates in guinea pigs*. **Levine BB, Ojeda A, Benacerraf B**. s.l. : Journal of Experimental Medicine, 1963, Vol. 118, pp. 953–957.
10. *Genetic control of the antibody response in inbred mice. Transfer of response by spleen cells and linkage to the major histocompatibility (H-2) locus*. **McDevitt HO, Tyan ML**. 1, s.l. : Journal of Experimental Medicine, 1968, Vol. 128, pp. 1-11.
11. *Genetic control of the antibody response: relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type*. **McDevitt HO, Chinitz A**. 3872, s.l. : Science, 1969, Vol. 163, pp. 1207–1208.
12. *H-2 dependence of co-operation between T and B cells in vivo*. **Kindred B, Shreffler DC**. s.l. : Journal of Immunology, 1972, Vol. 109, pp. 940–943.
13. *Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes*. **Rosenthal S, Shevach EM**. 5, s.l. : Journal of Experimental Medicine, 1973, Vol. 138, pp. 1194-1212.

14. *The discovery of MHC restriction.* **Zinkernagel RM, Doherty PC.** 1, s.l. : Immunology Today, 1997, Vol. 18, pp. 14–17.
15. *A biological role for the major histocompatibility antigens.* **Doherty PC, Zinkernagel RM.** 7922, s.l. : The Lancet, 1975, Vol. 305, pp. 1406-1409.
16. *Papel de los polimorfismos en genes HLA y no-HLA en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.* **Reséndiz-Hernández Juan M., Camarena Ángel, Ramírez-Venegas Alejandra, Sansores Raúl H., Pérez-Rubio Gloria, Montañó Martha, Falfán-Valencia Ramcés.** 4, s.l. : Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 2009, Vol. 22, pp. 347-355.
17. *Complete sequence and genemap of a human major histocompatibility complex.* **The MHC sequencing consortium.** s.l. : NATURE, 1999, Vol. 401, pp. 921-923.
18. *Gene map of the extended human MHC.* **Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey Sue, Talbot CC, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S.** s.l. : NATURE Reviews. Genetics, 2004, Vol. 5, pp. 889-899.
19. *Evolving views of the major histocompatibility complex.* **Gruen JR, Weissman SM.** 11, s.l. : Blood, 1997, Vol. 90, pp. 4252-4265.
20. **Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, Arnaiz-Villena A.** El Sistema Principal de Histocompatibilidad Humano (HLA) y el trasplante hepático. [book auth.] Loinaz C. Vicente E. *El Trasplante Hepático en el Comienzo del Milenio.* São Paulo : Atheneu, 2006, 3, pp. 37-62. <http://www.cirugiasanchinarro.es/actividad-cientifica.aspx>.
21. **Anthony Nolan, Research Institute.** HLA nomenclature. [Online] Octubre 15, 2012. [Cited: Noviembre 16, 2012.] <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>.
22. *Human Leukocyte Antigen Gene Polymorphism and the Histocompatibility Laboratory.* **Williams, TM.** 3, s.l. : The Journal of Molecular Diagnostics, 2001, Vol. 3, pp. 98–104.
23. *El papel de la genética de poblaciones en la inmunología del trasplante en México.* **Barquera Lozano, R.** s.l. : Gaceta médica de México, 2012, Vol. 148, pp. 52-67.
24. *High-resolution human leukocyte antigen (HLA) haplotypes and linkage disequilibrium of HLA-B and -C and HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in a Taiwanese population.* **Yang KL, Chen SP, Shyr MH, Lin PY.** 4, s.l. : Human Immunology, 2009, Vol. 70, pp. 269-276.
25. *Haplotype blocks and Linkage Disequilibrium in the human genome.* **Wall JD, Pritchard JK.** s.l. : Nature Reviews. Genetics, 2003, Vol. 4, pp. 587-597.
26. *HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico.* **Barquera, R., Zúñiga, J., Hernández-Díaz, R., Acuña-Alonzo, V., Montoya-Gama, K., Moscoso, J., Torres-García, D., García-Salas, C., Silva, B., Cruz-Robles, D., Arnaiz-Villena, A., Vargas-Alarcón, G., Granados, J.** 4, s.l. : Molecular Immunology, 2008, Vol. 45, pp. 1171-1178.

27. *Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks.* **Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Viña M, Awdeh ZL, Romero T, Hansen JA, Alper CA.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 2003, Vol. 62, pp. 1-20.
28. *Long-range multilocus haplotype phasing of the MHC.* **Guo Z, Hood L, Malkki M, Petersdorf EW.** 18, s.l. : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, Vol. 103, pp. 6964–6969.
29. What Does P and G Mean in HLA Nomenclature. *HLA Alleles and Tissue Typing. Human Leukocyte Antigen Information and Typing.* [Online] Enero 13, 2011. [Cited: Octubre 12, 2012.] <http://hlatype.com/what-does-p-and-g-mean-in-hla-nomenclature/>.
30. **Robinson J, Halliwell JA, Marsh SGE.** Exon Identity and Ambiguous Typing Combinations. *European Molecular Biology Laboratory. European Bioinformatics Institute.* [Online] Julio 12, 2012. [Cited: Octubre 02, 2012.] [http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/pdf/ambiguity\\_v390.pdf](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/pdf/ambiguity_v390.pdf).
31. *Nomenclature for factors of the HLA system, 2010.* **Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lee KW, Maiers M, Müller CR, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J.** 4, s.l. : Tissue Antigens, 2010, Vol. 75, pp. 291-455.
32. **Manzanares B., González R., Peña J., Solana R., Jaraquemada D.** Moléculas de histocompatibilidad: ¿Qué son y para qué valen? *Inmunología en línea.* [Online] Noviembre 10, 2011. [Cited: Septiembre 03, 2012.] [http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com\\_content&view=article&id=67%3Ahistocompatibilidad&catid=40%3Ahistocompatibilidad&Itemid=126&showall=1](http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com_content&view=article&id=67%3Ahistocompatibilidad&catid=40%3Ahistocompatibilidad&Itemid=126&showall=1).
33. *Importancia de las moléculas KIR en el trasplante.* **Pérez-Rodríguez, M.** 1, s.l. : Revista Mexicana de Medicina Transfusional, 2010, Vol. 3, pp. S21-S23.
34. *Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why.* **CM., Gardiner.** 1, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2008, Vol. 35, pp. 1-8.
35. *Los métodos serológicos y moleculares en la tipificación de los antígenos de leucocitos humanos mini-revision.* **Bonet Roselló L, Martínez Córdova Z.** 4, s.l. : Bioquímica. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, 2004, Vol. 29, pp. 126-130.
36. *Complejo mayor de histocompatibilidad.* **Vega, GB.** 2, s.l. : Revista de la Facultad de Medicina. UNAM., 2009, Vol. 52, pp. 86-88.
37. *Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad.* **López-Martínez A, Chávez-Muñoz C, Granados J.** 2, s.l. : Revista de Investigación Clínica, 2005, Vol. 57, pp. 132-141.
38. **González MF, Núñez A.** Inmunología de los Trasplantes. *Inmunología en línea.* [Online] Universidad de Córdoba, España., Noviembre 10, 2011. [Cited: Septiembre 03, 2012.]

[http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com\\_content&view=article&id=117:trasplantes&catid=50:inmunopatologia&Itemid=126](http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com_content&view=article&id=117:trasplantes&catid=50:inmunopatologia&Itemid=126).

39. *La biología molecular y su aplicación en el Banco de Sangre. Una herramienta a nuestro alcance.* **Martínez-Álvarez J.C., Arrazola-García A., Suárez-Cruz A.** 2, s.l. : Gaceta Médica de México, 2007, Vol. 143, pp. 43-51.
40. *HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation.* **Laperrousaz S, Tiercy JM, Villard J, Ferrari-Lacraz S.** w13668, s.l. : Swiss Medical Weekly. The European Journal of Medical Sciences, 2012, Vol. 142, pp. 1-12.
41. *An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004.* **Shiina T, Inoko H, Kulski JK.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2004, Vol. 64, pp. 631-649.
42. **Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC, Suzuki DT.** *An Introduction To Genetic Analysis.* Octava edición. New York : Freeman, 2005. pp. 727, 735, 741.
43. *Subtipos de HLA-B27 en familias de pacientes mestizos mexicanos con espondilitis anquilosante.* **Martínez-Álvarez JC, Navarrete AP, Arrazola A, Suárez A, Zonana-Nacach A, Camargo A, García B, Rivera R, Ambriz R, Jiménez-Balderas FJ.** 1, s.l. : Revista Mexicana de Medicina Transfusional, 2008, Vol. 1, pp. 18-22.
44. *Estudio de los genes HLA-DQA1 y KIR en poblaciones mexicanas.* **Buentello L, Peñaloza R, Palma R, Gutiérrez M, Salamanca F.** s.l. : UNAM, 2007, Estudios de Antropología Biológica , Vol. XIII, pp. 557-570.
45. *HLA-A, -B y -Cw allele frequencies in a hispanic population from the USA.* **Cao K, Hollenbach JA, Shi XL, Shi WX, Chopek M, Fernández-Viña MA.** s.l. : Human Immunology, 2004, Vol. 65, pp. 1206-1208.
46. *HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: The National Marrow Donor Program Donor Registry 1.* **Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL.** s.l. : Transplantation, 1997, Vol. 64, pp. 1017-1027.
47. *Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations.* **Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernández-Viña MA.** 9, s.l. : Human Immunology, 2001, Vol. 62, pp. 1009-1030.
48. *Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents.* **Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, Nascimento E, Briceno I, Perez MP.** 10, s.l. : Human Immunology, 2000, Vol. 61, pp. 1048-1052.

49. *Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents.* **Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, Nascimento E, Middleton D.** 6, s.l. : Human Immunology, 2001, Vol. 62, pp. 645–650.
50. *Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC.* **Ahmad T, Neville M, Marshall SE, Armuzzi A, Mulcahy-Hawes K, Crawshaw J, Sato H, Ling KL, Barnardo M, Goldthorpe S, Walton R, Bunce M, Jewell DP, Welsh KI.** 6, s.l. : Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, pp. 647-656.
51. *Utility of HLAMatchmaker and single-antigen HLA-antibody detection beads for identification of acceptable mismatches in highly sensitized patients awaiting kidney transplantation.* **Goodman RS, Taylor CJ, O'Rourke CM, Lynch A, Bradley JA, Key T.** 9, s.l. : Transplantation, 2006, Vol. 81, pp. 1331-1336.
52. *HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. V. Eplet matching for HLA-DR, HLA-DQ, and HLA-DP.* **Duquesnoy RJ, Askar M.** 1, s.l. : Human Immunology, 2007, Vol. 68, pp. 12-25.
53. *Is the application of HLAMatchmaker relevant in kidney transplantation?* **Duquesnoy RJ, Claas FH.** 2, s.l. : Transplantation, 2005, Vol. 79, pp. 250-251.
54. *A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level.* **Duquesnoy, RJ.** 11, s.l. : Human Immunology, 2006, Vol. 67, pp. 847-862.
55. **Yunis EJ, Zúñiga J, Larsen CE, Fernández-Viña M, Granados J, Awdeh ZL, Alper CA.** Single Nucleotide Polymorphism blocks and haplotypes: Human MHC block diversity. [book auth.] R.A. (Ed.) Meyers. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine.* Segunda edición. s.l. : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, Vol. 13, pp. 191–215.
56. **Hartl Daniel, Jones Elizabeth W.** *Genetics. Analysis of genes and genomes.* Séptima edición. EUA : Jones and Bartlett Publishers, 2009. pp. 620-624.
57. **Kalmes R, Huret JL.** Modelo de Hardy-Weinberg. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.* [Online] Dept Medical Information, University Hospital of Poitiers, France., Febrero 2001. [Cited: Abril 08, 2012.] <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/HardySp.html>.
58. *A tutorial on statistical methods for population association studies.* **Balding, DJ.** 10, s.l. : Nature Reviews. Genetics, 2006, Vol. 7, pp. 781-791.
59. **Govea Villaseñor, Rafael.** Ley de Hardy-Weinberg. *Slideshare.* [Online] Febrero 2011. <http://www.slideshare.net/govearra/equlibrio-de-hardyweinberg>.
60. **Scheinvar-Gottdiener E, Macip R.** Las poblaciones en equilibrio (El equilibrio Hardy-Weinberg). *Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental.* [Online] Febrero 12, 2011. [Cited: Abril 06,

2012.]

[http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseEvolucion1/Enrique/03-0\\_HW.pdf](http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseEvolucion1/Enrique/03-0_HW.pdf).

61. *The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites.* **Gorodezky C, Alaez C, Vázquez-García MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Pérez-Luque E, Muñoz L.** 9, s.l. : Human Immunology, 2001, Vol. 62, pp. 979-991.
62. **Mirambell, L.** El poblamiento del continente americano: La vida de sus primeros pobladores. . *Historia General de la Medicina en México. México Antiguo, Vol. 1.* México : UNAM-Academia Nacional de Medicina., 1984.
63. *Reconstructing Native American population history.* **Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, Ray N, Parra MV, Rojas W, Duque C, Mesa N, García LF, Triana O, Blair S, Maestre A, Dib JC, Bravi CM, Bailliet G, Corach D, Hünemeier T, Bortolini MC, Salzano F, Petzl-Erler M, Acuña-Alonzo V, et al.** 7411, s.l. : Nature, 2012, Vol. 488, pp. 370-374.
64. *El universo de los conquistadores: resultado de una investigación prosopográfica.* **Grunberg, B.** s.l. : Signos Históricas, 2004, Vol. 12, pp. 94-118.
65. **Aguirre-Beltrán, G.** *La población negra de México. Estudio etnohistórico.* Segunda edición. México : Fondo de Cultura Económica, 1972.
66. *Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos.* **Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, Gallo C, Poletti G, Mazzotti G, Hill K, Hurtado AM, Camrena B, Nicolini H, Klitz W, Barrantes R, Molina JA, Freimer NB, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Dipierri JE, Alfaro EL, et al.** 3, s.l. : PLoS Genet , 2008, Vol. 4, p. e1000037.
67. *Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis.* **Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutiño T, Rodríguez-Pérez JM, Villarreal-Garza C, Granados J.** 1, s.l. : Human Immunology, 2003, Vol. 64, pp. 119-123.
68. *Class I and class II MHC polymorphisms in Mexican patients with Behçet's disease.* **Soto-Vega E, García-Muñoz R, Richaud-Patin Y, Zúñiga-Ramos J, Crispín JC, Díaz-Jouanen E, Flores-Suárez LF, Llorente L, Granados J.** 2-3, s.l. : Immunology Letters, 2004, Vol. 93, pp. 211-215.
69. **CONAPO, Consejo Nacional de la Población.** *Programa Nacional de Población 2001-2006. Informe de Ejecución 2003-2004.* México : s.n., 2004.
70. **Arellano Trejo, E.** Definición. *Migración, Frontera y Población.* [Online] Centro de Estudios Sociales y de Opinión Pública. Dirección de Opinión Pública. Cámara de Diputados, Febrero 16, 2006. [Cited: Octubre 03, 2012.]  
[http://archivos.diputados.gob.mx/Centros\\_Estudio/Cesop/Comisiones/d\\_poblacion.htm#\\_ftn5](http://archivos.diputados.gob.mx/Centros_Estudio/Cesop/Comisiones/d_poblacion.htm#_ftn5).

71. *Indígenas en zonas metropolitanas. La situación demográfica en México.* **Martínez MA, García JE, Fernández P.** México : Consejo Nacional de Población (CONAPO), 2003, La situación demográfica de México., pp. 155-164.
72. **López R, Velarde SI.** Aplicación de medidas de concentración para el análisis demográfico de la migración interna en México. *La situación demográfica de México 2011.* México : CONAPO, 2011, pp. 123-139.
73. **Yanes Rizo, PE.** *El desafío de la diversidad. Los pueblos indígenas, la Ciudad de México y las políticas del gobierno del Distrito Federal, 1998-2006.* México D.F. : s.n., 2007. pp. 69-111 y 145-185.
74. **Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI).** *La población hablante de lengua indígena del Distrito Federal.* México : INEGI, 2004. pp. 26-32.
75. —. *Principales resultados del Censo de Población y Vivienda 2010 Distrito Federal.* México : INEGI, 2011.
76. —. *Principales resultados del Censo de Población y Vivienda 2010 México.* México : INEGI, 2011.
77. *The HLA system: an update and relevance to patient-donor matching strategies in clinical transplantation.* **Howell WM, Navarrete C.** 1, s.l. : Vox Sanguinis, 1996, Vol. 71, pp. 6-12.
78. *Biological differences on onset among type 1A diabetics in relation to HLA-DQ genetic markers.* **Giralt Muiña P, Urra Ardanaz JM, Sanabria Pérez C, Giralt Muiña J, Pérez Rodríguez MJ, Benito López P.** 1, s.l. : Medicina Clínica, 2003, Vol. 120, pp. 6-9.
79. *HLA haplotypes and susceptibility to rheumatoid arthritis. More than class II genes.* **Pascual M, Matarán L, Jones G, Shing D, van der Slik AR, Giphart MJ, Schreuder GM, de Vries RR, Breedveld FC, Roovers E, Zanelli E, Martin J.** 5, s.l. : Scandinavian Journal of Rheumatology, 2002, Vol. 31, pp. 275-278.
80. **González Molina M, Alonso Ortiz A.** *Biología de la Inmunosupresión del Trasplante de Órganos.* Barcelona : Novartis Farmacéutica S A, 2005.
81. *The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview.* **McCluskey J, Au Peh C.** 1, s.l. : Reviews in Immunogenetics, 1999, Vol. 1, pp. 3-20.
82. *HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice during donor-recipient matching in cadaveric transplantation.* **Olerup O, Zetterquist H.** s.l. : Tissue Antigens, 1992, Vol. 39, pp. 225-235.
83. *A new approach for the analysis of HLA class II polymorphism: HLA oligotyping.* **Tiercy JM, Jeannet M, Mach B.** 1, s.l. : Blood Reviews, 1990, Vol. 4, pp. 9-15.

84. **Colombe, BW.** Histocompatibility testing. [book auth.] Terr AI, Parslow TG. Stites DP. *Basic and Clinical Immunology*. Octava. s.l. : Appleton & Lange, 1994, pp. 237-255.
85. *Identification of MHC-molecular biology.* **Middleton, D.** 2, s.l. : Transplant Immunology, 1994, Vol. 2, pp. 111-115.
86. **Reynaga, J.** Prueba de comparación de dos proporciones. . *Pruebas estadísticas para comprobación de hipótesis con datos cualitativos. Epidemiología y Estadística Analíticas*. [Online] Octubre 2010. [Cited: Julio 02, 2012.]  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/planunico/spii/antologia2012/5.pdf>.
87. *Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis.* **Excoffier L, Laval G, Schneider S.** s.l. : Evolutionary Bioinformatics Online, 2007, Vol. 1, pp. 47-50.
88. **Vogel F, Motulsky AG.** *Human genetics: Problems and approaches*. Tercera. New York : Springer, 1997.
89. *HLA alleles and haplotypes among the Lakota Sioux: report of the ASHI minority workshops, part III.* **Leffell, M.S., Danielle Fallin, M., Hildebrand, W.H., Cavett, J.W., Iglehart, B.A., Zachary, A.** 1, s.l. : Human Immunology, 2004, Vol. 65, pp. 78-89.
90. *Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations.* **Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Zuñiga J, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Rangel C, Villarreal-Garza C, Martínez-Laso J, Granados J, Arnaiz-Villena A.** 11, s.l. : Immunogenetics, 2003, Vol. 54, pp. 756-760.
91. *HLA genes in Mexican Mazatecas, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians.* **Arnaiz-Villena, A., Vargas-Alarcón, G., Granados, J., Gómez-Casado, E., Longás, J., González-Hevilla, M., Zúñiga, J., Salgado, N., Hernández-Pacheco, G., Guillén J., Martínez-Laso, J.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2000, Vol. 56, pp. 405-416.
92. *Origin of the Mayans according to HLA genes and the uniqueness of Amerindians.* **Gómez-Casado, E., Martínez-Laso, J., Moscoso J., Zamora, J., Martín-Villa, J. M., Pérez-Blas, M., López-Santalla, M., Lucas-Gramajo, P., Silvera, C., Lowy, E., Arnaiz-Villena, A.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2003, Vol. 61, pp. 425-436.
93. *Extended HLA haplotypes in a carib Amerindian population: the Yucpa of the Perija Range.* **Layrisse, Z., Guedez, Y., Domínguez, E., Paz, N., Montagnani, S., Matos, M., Herrera, F., Ogando, V., Balbas, O., Rodríguez-Larralde, A.** 9, s.l. : Human Immunology, 2001, Vol. 62, pp. 992-1000.
94. *HLA antigens, alleles and haplotypes among the Yupik Alaska natives: report of the ASHI minority workshops, part II.* **Leffell, M.S., Fallin, M.D., Erlich, H.A., Fernández-Viña, M., Hildebrand, W.H., Mack, S., Zachary, A.** 7, s.l. : Human Immunology, 2002, Vol. 63, pp. 614-625.

95. *High-resolution molecular characterization of the HLA class I and class II in the Tarahumara Amerindian population.* **García-Ortiz JE, Sandoval-Ramírez L, Rangel-Villalobos H, Maldonado-Torres H, Cox S, García-Sepúlveda CA, Figuera LE, Marsh SG, Little AM, Madrigal JA, Moscoso J, Arnaiz-Villena A, Argüello JR.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2006, Vol. 68, pp. 135-146.
96. *Origin of Mexican Nahuas (Aztecs) according to HLA genes and their relationships with worldwide populations.* **Vargas-Alarcon G, Moscoso J, Martinez-Laso J, Rodriguez-Perez JM, Flores-Dominguez C, Serrano-Vela JI, Moreno A, Granados J, Arnaiz-Villena A.** 5, s.l. : Molecular Immunology, 2007, Vol. 44, pp. 747-755.
97. *HLA genes in Uros from Titikaka Lake, Peru: origin and relationship with other Amerindians and worldwide populations.* **Arnaiz-Villena, A., González –Alcos, V., Serrano-Vela, J.I., Reguera, R., Barbolla, L., Parga-Lozano, C., Gómez-Prieto, P., Abd-El-Fatah-Khalil, S., Moscoso, J.** 3, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2009, Vol. 36, pp. 159-167.
98. *Origin of Bolivian Quechua Amerindians: their relationship with other American Indians and Asians according to HLA genes.* **Martinez-Laso J, Siles N, Moscoso J, Zamora J, Serrano-Vela JI, R-A-Cachafeiro JI, Castro MJ, Serrano-Rios M, Arnaiz-Villena A.** 2, s.l. : European Journal of Medical Genetics, 2006, Vol. 49, pp. 169–185.
99. *Origin of Aymaras from Bolivia and their relationships with other Amerindians according to HLA genes.* **Arnaiz-Villena, A., Siles, N., Moscoso, J., Zamora, J., Serrano-Vela, J.I., Gómez-Casado, E., Castro M.J., Martínez-Laso, J.** 4, s.l. : Tissue Antigens, 2005, Vol. 65, pp. 379-390.
100. *HLA genes of Aleutian Islanders living between Alaska (USA) and Kamchatka (Russia) suggest a possible southern Siberia origin.* **Moscoso J, Crawford MH, Vicario JL, Zlojutro M, Serrano-Vela JI, Reguera R, Arnaiz-Villena A.** 4, s.l. : Molecular Immunology, 2008, Vol. 45, pp. 1018-1026.
101. *HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 and DPB1 alleles and haplotypes in the genetically homogenous Irish population.* **Dunne, C., Crowley, J., Hagan, R., Rooney, G., Lawlor, E.** 4-5, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2008, Vol. 35, pp. 295-302.
102. *HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): In the cradle of the archaeological Iberians.* **Muro, M., Marin, L., Torio, A., Moya-Quiles, M.R., Minguela, A., Rosique-Roman, J., Sanchis, M.J., Garcia-Calatayud, M.C., Garcia-Alonso, A.M., Alvarez-Lopez, M.R.** 9, s.l. : Human Immunology, 2001, Vol. 62, pp. 910–921.
103. *HLA genes in Mexican Teeneks: HLA genetic relationship with other worldwide populations.* **Vargas-Alarcon, G., Hernandez-Pacheco, G., Moscoso, J., Perez-Hernandez, N., Murguia, L.E., Moreno, A., Serrano-Vela, J.I., Granados, J., Arnaiz-Villena, A.** s.l. : Molecular Immunology, 2006, Vol. 43, pp. 790–799.
104. *Evolution of HLA-class I compared to HLA-class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe.* **Lazaro, A.M., Moraes, M.E., Marcos, C.Y., Moraes, J.R., Fernandez-Vina, M.A., Stastny, P.** 11, s.l. : Human Immunology, 1999, Vol. 60, pp. 1138–1149.

105. *Polymorphism of the HLA class II loci in Siberian populations.* **Grahovac, B., Sukernik, R.I., O'hUigin, C., Zaleska-Rutczynska, Z., Blagitko, N., Raldugina, O., Kosutic, T., Satta, Y., Figueroa, F., Takahata, N., Klein, J.** 1, s.l. : Human Genetics, 1998, Vol. 102, pp. 27-43.
106. *HLA genes in Lamas Peruvian–Amazonian Amerindians.* **Moscoso J, Seclen S, Serrano-Vela JI, Villena A, Martinez-Laso J, Zamora J, Moreno A, Ira-Cachafeiro J, Arnaiz-Villena A.** s.l. : Molecular Immunology, 2006, Vol. 43, pp. 1881–1889.
107. *HLA-A and HLA-B allele frequencies in a mestizo population from Guadalajara, Mexico, determined by sequence-based typing.* **Leal CA, Mendoza-Carrera F, Rivas F, Rodriguez-Reynoso S, Portilla-de Buen E.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2005, Vol. 66, pp. 666-673.
108. *HLA diversity, differentiation, and haplotype evolution in Mesoamerican Natives.* **Hollenbach JA, Thomson G, Cao K, Fernandez-Vina M, Erlich HA, Bugawan TL, Winkler C, Winter M, Klitz W.** 4, s.l. : Human Immunology, 2001, Vol. 62, pp. 378–390.
109. *HLA genes in Cubans and the detection of Amerindian alleles.* **Alegre R, Moscoso J, Martinez-Laso J, Martin-Villa M, Suarez J, Moreno A, Serrano-Vela JI, Vargas-Alarcon G, Pacheco R, Arnaiz-Villena A.** 9, s.l. : Molecular Immunology, 2007, Vol. 44, pp. 2426-2435.
110. *Colonia Tovar: the history of a semi-isolated Venezuelan population of German ancestry described by HLA class I genes.* **Gendzekhadze K, Montagnani S, Ogando V, Balbas O, Mendez-Castellano H, Layrisse Z.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2003, Vol. 62, pp. 401-407.
111. *Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Paraná, Brazil.* **Ruiz TM, da Costa SM, Ribas F, Luz PR, Lima SS, da Graça Bicalho M.** 5, s.l. : Transplantation Proceedings, 2005, Vol. 37, pp. 2293-2296.
112. *Distribution of HLA alleles in Portugal and Cabo Verde. Relationships with the slave trade route.* **Spínola H, Brehm A, Williams F, Jesus J, Middleton D.** 4, s.l. : Annals of Human Genetics, 2002, Vol. 66, pp. 285-296.
113. *HLA-A, -B, -C polymorphism in a UK Ashkenazi Jewish potential bone marrow donor population.* **Cox ST, Marsh SG, Scott I, Clayton J, Argüello JR, McWhinnie AJ, Prokupek B, Holman R, Madrigal JA, Little AM.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 1999, Vol. 53, pp. 41-50.
114. *West Mediterranean islands (Corsica, Balearic islands, Sardinia) and the Basque population: contribution of HLA class I molecular markers to their evolutionary history.* **Grimaldi MC, Crouau-Roy B, Amoros JP, Cambon-Thomsen A, Carcassi C, Orru S, Viader C, Contu L.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2001, Vol. 58, pp. 281-292.
115. *Molecular analysis of HLA allele frequencies and haplotypes in Baloch of Iran compared with related populations of Pakistan.* **Farjadian S, Naruse T, Kawata H, Ghaderi A, Bahram S, Inoko H.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2004, Vol. 64, pp. 581-587.

116. *HLA polymorphism in Bulgarians defined by high-resolution typing methods in comparison with other populations.* **Ivanova M, Rozemuller E, Tyufekchiev N, Michailova A, Tilanus M, Naumova E.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2002, Vol. 60, pp. 496-504.
117. *Frequencies of HLA-A, HLA-B, HLA-DR, and HLA-DQ phenotypes in the United Arab Emirates population.* **Valluri V, Mustafa M, Santhosh A, Middleton D, Alvares M, El Haj E, Gumama O, Abdel-Wareth L.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2005, Vol. 66, pp. 107-113.
118. *HLA-A, -B, -DR and -DQ allele and haplotype frequencies in the Moroccan population: a general population study.* **Brick C, Bennani N, Atouf O, Essakalli M.** 6, s.l. : Transfusion Clinique et Biologique, 2006, Vol. 13, pp. 346–352.
119. *HLA polymorphisms in Cabo Verde and Guiné-Bissau inferred from sequence-based typing.* **Spínola H, Bruges-Armas J, Middleton D, Brehm A.** 10, s.l. : Human Immunology, 2005, Vol. 66, pp. 1082–1092.
120. *Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci.* **Cao K, Moormann AM, Lyke KE, Masaberg C, Sumba OP, Doumbo OK, Koech D, Lancaster A, Nelson M, Meyer D, Single R, Hartzman RJ, Plowe CV, Kazura J, Mann DL, Sztejn MB, Thomson G, Fernández-Viña MA.** 4, s.l. : Tissue Antigens, 2004, Vol. 63, pp. 293-325.
121. *Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population.* **Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Choi HB, Kim TY, Kim TG.** 3, s.l. : Human Immunology, 2003, Vol. 64, pp. 378-384.
122. *Distribution of HLA-A alleles in eight ethnic groups from Pakistan.* **Mohyuddin A, Williams F, Mansoor A, Mehdi SQ, Middleton D.** 4, s.l. : Tissue Antigens, 2003, Vol. 61, pp. 286-291.
123. *HLA polymorphism in six ethnic groups from Pakistan.* **Mohyuddin A, Ayub Q, Khaliq S, Mansoor A, Mazhar K, Rehman S, Mehdi SQ.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2002, Vol. 59, pp. 492-501.
124. *HLA-A, -B and -DRB1 allele frequencies in the Bangladeshi population.* **Ali ME, Ahmed MU, Alam S, Rahman MH.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2008, Vol. 72, pp. 115-119.
125. *HLA gene and haplotype frequencies in Russians, Bashkirs and Tatars, living in the Chelyabinsk Region (Russian South Urals).* **Suslova TA, Burmistrova AL, Chernova MS, Khromova EB, Lupar EI, Timofeeva SV, Devald IV, Vavilov MN, Darke C.** 2, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2012, Vol. 39. Article first published online 20 APR 2012.
126. *HLA-A, -B, -C, -DQB1, and -DRB1,3,4,5 allele and haplotype frequencies in the Costa Rica Central Valley Population and its relationship to worldwide populations.* **Arrieta-Bolaños E, Maldonado-Torres H, Dimitriu O, Hoddinott MA, Fowles F, Shah A, Orlich-Pérez P, McWhinnie AJ, Alfaro-Bourrouet W, Buján-Boza W, Little AM, Salazar-Sánchez L, Madrigal JA.** 1, s.l. : Human Immunology, 2011, Vol. 72, pp. 80–86.

127. *Diversity of HLA among Taiwan's indigenous tribes and the Ivatans in the Philippines.* **Chu CC, Lin M, Nakajima F, Lee HL, Chang SL, Juji T, Tokunaga K.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 2001, Vol. 58, pp. 9–18.
128. *Allele resolution of HLA-A using oligonucleotide probes in a two-stage typing strategy.* **Williams F, Meenagh A, Maxwell AP, Middleton D.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 1999, Vol. 54, pp. 59-68.
129. *Frequency of HLA-B alleles in a Caucasoid population determined by a two-stage PCR-SSOP typing strategy.* **Middleton D, Williams F, Hamill MA, Meenagh A.** 12, s.l. : Human Immunology, 2000, Vol. 61, pp. 1285–1297.
130. *Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning.* **Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, Ehringer G, Rutt C.** 11, s.l. : Human Immunology, 2009, Vol. 70, pp. 895-902.
131. *Genetic origin of the Swedish Sami inferred from HLA class I and class II allele frequencies.* **Johansson A, Ingman M, Mack SJ, Erlich H, Gyllensten U.** 11, s.l. : European Journal of Human Genetics, 2008, Vol. 16, pp. 1341–1349.
132. *HLA class I and II polymorphisms in Azores show different settlements in Oriental and Central islands.* **Spínola H, Brehm A, Bettencourt B, Middleton D, Bruges-Armas J.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 2005, Vol. 66, pp. 217–230.
133. *The origin of Minnan and Hakka, the so-called "Taiwanese", inferred by HLA study.* **Lin M, Chu CC, Chang SL, Lee HL, Loo JH, Akaza T, Juji T, Ohashi J, Tokunaga K.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 2001, Vol. 57, pp. 192-199.
134. *Genetic link among Hani, Bulang and other Southeast Asian populations: evidence from HLA -A, -B, -C, -DRB1 genes and haplotypes distribution.* **Shi L, Shi L, Yao YF, Matsushita M, Yu L, Huang XQ, Yi W, Oka T, Tokunaga K, Chu JY.** 6, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2010, Vol. 37, pp. 467-475.
135. *Evaluation of computational methods for the reconstruction of HLA haplotypes.* **Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Pereira NF, Petzl-Erler ML, Donadi EA.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2010, Vol. 76, pp. 459-466.
136. *HLA genes in Madeira Island (Portugal) inferred from sequence-based typing: footprints from different origins.* **Spínola H, Bruges-Armas J, Mora MG, Middleton D, Brehm A.** 10, s.l. : Molecular Immunology, 2006, Vol. 43, pp. 1726-1728.
137. *HLA class I and class II DNA typing and the origin of Basques.* **Comas D, Mateu E, Calafell F, Pérez-Lezaun A, Bosch E, Martínez-Arias R, Bertranpetit J.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 1998, Vol. 51, pp. 30-40.

138. *Gene and haplotype frequencies for the loci hLA-A, hLA-B, and hLA-DR based on over 13,000 german blood donors.* Müller CR, Ehninger G, Goldmann SF. 1, s.l. : Human Immunology, 2003, Vol. 64, pp. 137–151.
139. *Polymorphism of HLA in the Romanian population.* Reed E, Ho E, Lupu F, McManus P, Vasilescu R, Foca-Rodi A, Suci-Foca N. 1, s.l. : Tissue Antigens, 1992, Vol. 39, pp. 8-13.
140. *HLA allele and haplotype frequencies in the Albanian population and their relationship with the other European populations.* Sulcebe G, Sanchez-Mazas A, Tiercy JM, Shyti E, Mone I, Ylli Z, Kardhashi V. 6, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2009, Vol. 36, pp. 337-343.
141. *The HLA class I and class II allele frequencies studied at the DNA level in the Svanetian population (Upper Caucasus) and their relationships to Western European populations.* Sánchez-Velasco P, Leyva-Cobián F. 4, s.l. : Tissue Antigens, 2001, Vol. 58, pp. 223-233.
142. *HLA genes in Macedonians and the sub-Saharan origin of the Greeks.* Arnaiz-Villena A, Dimitroski K, Pacho A, Moscoso J, Gómez-Casado E, Silvera-Redondo C, Varela P, Blagoevska M, Zdravkovska V, Martínez-Laso J. 2, s.l. : Tissue Antigens, 2001, Vol. 57, pp. 118-127.
143. *HLA class-I and HLA class-II phenotypic, gene and haplotypic frequencies in Tunisians by using molecular typing data.* Ayed K, Ayed-Jendoubi S, Sfar I, Labonne MP, Gebuhrer L. 4, s.l. : Tissue Antigens, 2004, Vol. 64, pp. 520-532.
144. *The contribution of HLA class I and II alleles and haplotypes to the investigation of the evolutionary history of Tunisians.* Hajje A, Kâabi H, Sellami MH, Dridi A, Jeridi A, El borgi W, Cherif G, Elgaâied A, Almawi WY, Boukef K, Hmida S. 2, s.l. : Tissue Antigens, 2006, Vol. 68, pp. 153-162.
145. *HLA genes in Arabic-speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians.* Gómez-Casado E, del Moral P, Martínez-Laso J, García-Gómez A, Allende L, Silvera-Redondo C, Longas J, González-Hevilla M, Kandil M, Zamora J, Arnaiz-Villena A. 3, s.l. : Tissue Antigens, 2000, Vol. 55, pp. 239-249.
146. *HLA polymorphisms in Forros and Angolares from São Tomé Island (West Africa): Evidence for the Population Origin.* Saldanha N, Spínola C, Santos MR, Simões JP, Bruges-Armas J, Brehm A, Spínola H. 2, s.l. : Journal of Genetic Genealogy, 2009, Vol. 5, pp. 76-85.
147. *Heterogeneity of Taiwan's indigenous population: possible relation to prehistoric Mongoloid dispersals.* Lin M, Chu CC, Lee HL, Chang SL, Ohashi J, Tokunaga K, Akaza T, Juji T. 1, s.l. : Tissue Antigens, 2000, Vol. 55, pp. 1-9.
148. *HLA polymorphism in three indigenous populations of Sabah and Sarawak.* Dhaliwal JS, Shahnaz M, Azrena A, Irda YA, Salawati M, Too CL, Lee YY. 2, s.l. : Tissue Antigens, 2010, Vol. 75, pp. 166-169.

149. *HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities.* **Crespí C, Milà J, Martínez-Pomar N, Etxagibel A, Muñoz-Saa I, Priego D, Luque A, Pons J, Picornell A, Ramon M, Castro JA, Matamoros N.** 4, s.l. : Tissue Antigens, 2002, Vol. 60, pp. 282-291.
150. *The origin of Cretan populations as determined by characterization of HLA alleles.* **Arnaiz-Villena A, Iliakis P, González-Hevilla M, Longás J, Gómez-Casado E, Sfyridaki K, Trapaga J, Silvera-Redondo C, Matsouka C, Martínez-Laso J.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 1999, Vol. 53, pp. 213-226.
151. *HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans.* **Arnaiz-Villena A, Karin M, Bendikuze N, Gomez-Casado E, Moscoso J, Silvera C, Oguz FS, Sarper Diler A, De Pacho A, Allende L, Guillen J, Martinez Laso J.** 4, s.l. : Tissue Antigens, 2001, Vol. 57, pp. 308-317.
152. *The origin of Palestinians and their genetic relatedness with other Mediterranean populations.* **Arnaiz-Villena A, Elaiwa N, Silvera C, Rostom A, Moscoso J, Gómez-Casado E, Allende L, Varela P, Martínez-Laso J.** 9, s.l. : Human Immunology, 2001, Vol. 62, pp. 889-900.
153. *Human leukocyte antigen class I polymorphism in Miao, Bouyei, and Shui ethnic minorities of Guizhou, China.* **Chen S, Ren X, Liu Y, Hu Q, Hong W, Xu A.** 11, s.l. : Human Immunology, 2007, Vol. 68, pp. 928-933.
154. *HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam.* **Hoang BK, Hang NT, Kashiwase K, Ohashi J, Lien LT, Horie T, Shojima J, Hijikata M, Sakurada S, Satake M, Tokunaga K, Sasazuki T, Keicho N.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2008, Vol. 71, pp. 127-134.
155. *Distribution of HLA alleles and haplotypes in Jinuo and Wa populations in Southwest China.* **Shi L, Ogata S, Yu JK, Ohashi J, Yu L, Shi L, Sun H, Lin K, Huang XQ, Matsushita M, Horai S, Muramatsu M, Chu JY, Tokunaga K.** 1, s.l. : Human Immunology, 2008, Vol. 69, pp. 58-65.
156. *HLA alleles and haplotypes distribution in Dai population in Yunnan province, Southwest China.* **Shi L, Yao YF, Shi L, Matsushita M, Yu L, Lin QK, Tao YF, Oka T, Chu JY, Tokunaga K.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2010, Vol. 75, pp. 159-165.
157. *HLA polymorphism in six Malay subethnic groups in Malaysia.* **Edinur HA, Zafarina Z, Spínola H, Nurhaslindawaty AR, Panneerchelvam S, Norazmi MN.** 7, s.l. : Human Immunology, 2009, Vol. 70, pp. 518-526.
158. *HLA-A, -B and -DR allele and haplotype frequencies in Malays.* **Dhaliwal JS, Shahnaz M, Too CL, Azrena A, Maiselamah L, Lee YY, Irda YA, Salawati M.** 1, s.l. : Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 2007, Vol. 25, pp. 47-51.
159. *HLA molecular markers in Tuvinians: a population with both Oriental and Caucasoid characteristics.* **Martinez-Laso J, Sartakova M, Allende L, Konenkov V, Moscoso J, Silvera-**

**Redondo C, Pacho A, Trapaga J, Gomez-Casado E, Arnaiz-Villena A.** 3, s.l. : *Annals of Human Genetics*, 2001, Vol. 65, pp. 245-261.

160. *Origin of Tibeto-Burman speakers: evidence from HLA allele distribution in Lisu and Nu inhabiting Yunnan of China.* **Chen S, Hu Q, Xie Y, Zhou L, Xiao C, Wu Y, Xu A.** 6, s.l. : *Human Immunology*, 2007, Vol. 68, pp. 550-559.

161. *HLA class I (A, B) and II (DR, DQ) gene and haplotype frequencies in blood donors from Wales.* **Darke C, Guttridge MG, Thompson J, McNamara S, Street J, Thomas M.** 2, s.l. : *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 1998, Vol. 15, pp. 69-83.

162. *HLA alleles in isolated populations from North Spain: origin of the Basques and the ancient Iberians.* **Sanchez-Velasco P, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, Lowy E, Silvera C, Cemborain A, Leyva-Cobián F, Arnaiz-Villena A.** 5, s.l. : *Tissue Antigens*, 2003, Vol. 61, pp. 384-392.

163. *The peopling of Madeira Archipelago (Portugal) according to HLA genes.* **Arnaiz-Villena A, Reguera R, Ferri A, Barbolla L, Abd-El-Fatah-Khalil S, Bakhtiyarova N, Millan P, Moscoso J, Mafalda A, Serrano-Vela JI.** 1, s.l. : *International Journal of Immunogenetics*, 2009, Vol. 36, pp. 9-14.

164. *HLA class I and class II frequencies in patients with cutaneous malignant melanoma from southeastern Spain: the role of HLA-C in disease prognosis.* **Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Muro M, Moya-Quiles R, Marín LA, Montes-Ares O, Guerra N, Sánchez-Pedreño P, Frías JF, Lozano JA, García-Alonso AM, Alvarez-López MR.** 12, s.l. : *Immunogenetics*, 2006, Vol. 57, pp. 926-933.

165. *Correlation between genetic HLA class I and II polymorphisms and anthropological aspects in the Chaouya population from Morocco (Arabic speaking).* **Canossi A, Piancatelli D, Aureli A, Oumhani K, Ozzella G, Del Beato T, Liberatore G, El Aouad R, Adorno D.** 3, s.l. : *Tissue Antigens*, 2010, Vol. 76, pp. 177-193.

166. *Sequence-Based analysis of the HLA-DRB1 polymorphism in Metalsa Berber and Chaouya Arabic-speaking groups from Morocco.* **Oumhani K, Canossi A, Piancatelli D, Di Rocco M, Del Beato T, Liberatore G, Aureli A, Benjoaud A, El Aouad R, Adorno D, Casciani CU.** 2, s.l. : *Human Immunology*, 2002, Vol. 63, pp. 129-138.

167. *Diversity is demonstrated in class I HLA-A and HLA-B alleles in Cameroon, Africa: description of HLA-A\*03012, \*2612, \*3006 and HLA-B\*1403, \*4016, \*4703.* **Ellis JM, Mack SJ, Leke RF, Quakyi I, Johnson AH, Hurley CK.** 4, s.l. : *Tissue Antigens*, 2000, Vol. 56, pp. 291-302.

168. *High-resolution human leukocyte antigen allele and haplotype frequencies of the Polish population based on 20,653 stem cell donors.* **Schmidt AH, Solloch UV, Pingel J, Baier D, Böhme I, Dubicka K, Schumacher S, Rutt C, Skotnicki AB, Wachowiak J, Ehninger G.** 7, s.l. : *Human Immunology*, 2011, Vol. 72, pp. 558-565.

169. *Allele and extended haplotype polymorphism of HLA-A, -C, -B, -DRB1 and -DQB1 loci in Polish population and genetic affinities to other populations.* **Nowak J, Mika-Witkowska R, Polak M, Zajko M, Rogatko-Koroś M, Graczyk-Pol E, Lange A.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 2008, Vol. 71, pp. 193-205.
170. *Molecular analysis of HLA allelic frequencies and haplotypes in Jordanians and comparison with other related populations.* **Sánchez-Velasco P, Karadsheh NS, García-Martín A, Ruíz de Alegría C, Leyva-Cobián F.** 9, s.l. : Human Immunology, 2001, Vol. 62, pp. 901-909.
171. *HLA-A, -B, -DRB1 allele frequencies and haplotypic association from DNA typing data of 7096 Korean cord blood units.* **Yoon JH, Shin S, Park MH, Song EY, Roh EY.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2010, Vol. 75, pp. 170-173.
172. *HLA genes in the Chuvashian population from European Russia: admixture of Central European and Mediterranean populations.* **Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Moscoso J, Livshits G, Zamora J, Gomez-Casado E, Silvera-Redondo C, Melvin K, Crawford MH.** 3, s.l. : Human Biology, 2003, Vol. 75, pp. 375-392.
173. *HLA genes in Southern Tunisians (Ghannouch area) and their relationship with other Mediterraneans.* **Hajje A, Hmida S, Kaabi H, Dridi A, Jridi A, El Gaa I ed A, Boukef K.** 1, s.l. : European Journal of Medical Genetics, 2006, Vol. 49, pp. 43-56.
174. *Allelic and haplotypic diversity of HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 genes in the Korean population.* **Lee KW, Oh DH, Lee C, Yang SY.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2005, Vol. 65, pp. 437-447.
175. *HLA analysis of the Parsi (Zoroastrian) population in Pakistan.* **Mohyuddin A, Mehdi SQ.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2005, Vol. 66, pp. 691-695.
176. *Polymorphisms of human leucocyte antigen genes in Maonan people in China.* **Ogata S, Shi L, Matsushita M, Yu L, Huang XQ, Shi L, Sun H, Ohashi J, Muramatsu M, Tokunaga K, Chu JY.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2007, Vol. 69, pp. 154-160.
177. *Analysis of HLA class I and class II in Na-Dene and Amerindian populations from British Columbia, Canada.* **Monsalve MV, Edin G, Devine DV.** 1, s.l. : Human Immunology, 1998, Vol. 59, pp. 48-55.
178. *HLA-DQB1, -DQA1, -DRB1 linkage disequilibrium and haplotype diversity in a Mestizo population from Guadalajara, Mexico.* **Cortes LM, Baltazar LM, Perea FJ, Gallegos-Arreola MP, Flores SE, Sandoval L, Olivares N, Lorenz MG, Xu H, Barton SA, Chakraborty R, Rivas F.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2004, Vol. 63, pp. 458-465.
179. *Differences in HLA class II alleles of isolated South American Indian populations from Brazil and Argentina.* **Cerna M, Falco M, Friedman H, Raimondi E, Maccagno A, Fernandez-Viña M, Stastny P.** 4, s.l. : Human Immunology, 1993, Vol. 37, pp. 213-220.

180. *Dissimilar evolution of B-locus versus A-locus and class II loci of the HLA region in South American Indian tribes.* **Fernández-Viña MA, Lázaro AM, Marcos CY, Nulf C, Raimondi E, Haas EJ, Stastny P.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 1997, Vol. 50, pp. 233-250.
181. *HLA DQA, DQB, and DRB genotyping by oligonucleotide analysis: distribution of alleles and haplotypes in British caucasoids.* **Doherty DG, Vaughan RW, Donaldson PT, Mowat AP.** 1, s.l. : Human Immunology, 1992, Vol. 34, pp. 53-63.
182. *High-resolution DNA typing in immunoglobulin A deficiency confirms a positive association with DRB1\*0301, DQB1\*02 haplotypes.* **Reil A, Bein G, Machulla HK, Sternberg B, Seyfarth M.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 1997, Vol. 50, pp. 501-506.
183. *MHC class I and class II phenotype, gene, and haplotype frequencies in Greeks using molecular typing data.* **Papassavas EC, Spyropoulou-Vlachou M, Papassavas AC, Schipper RF, Doxiadis IN, Stavropoulos-Giokas C.** 6, s.l. : Human Immunology, 2000, Vol. 61, pp. 615-623.
184. *The inter-regional distribution of HLA class II haplotypes indicates the suitability of the Sardinian population for case-control association studies in complex diseases.* **Lampis R, Morelli L, Congia M, Macis MD, Mulargia A, Loddo M, De Virgiliis S, Marrosu MG, Todd JA, Cucca F.** 20, s.l. : Human Molecular Genetics, 2000, Vol. 9, pp. 2959-2965.
185. *HLA-DR and -DQ alleles in Italian patients with melanoma.* **Lulli P, Grammatico P, Brioli G, Catricalà C, Morellini M, Roccella M, Mariani B, Pennesi G, Roccella F, Cappellacci S, Trabace S.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 1998, Vol. 51, pp. 276-280.
186. *Similar incidence of type 1 diabetes in two ethnically different populations (Italy and Slovenia) is sustained by similar HLA susceptible/protective haplotype frequencies.* **Petrone A, Battelino T, Krzysnik C, Bugawan T, Erlich H, Di Mario U, Pozzilli P, Buzzetti R.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 2002, Vol. 60, pp. 244-253.
187. *Molecular analysis of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 polymorphism in Turkey.* **Saruhan-Direskeneli G, Uyar FA, Bakar S, Eraksoy M.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2000, Vol. 55, pp. 171-174.
188. *HLA DR and DQ polymorphism in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews: comparison with other Mediterraneans.* **Martinez-Laso J, Gazit E, Gomez-Casado E, Morales P, Martinez-Quiles N, Alvarez M, Martin-Villa JM, Fernandez V, Arnaiz-Villena A.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 1996, Vol. 47, pp. 63-71.
189. *Comparative analysis of HLA polymorphism at the serologic and molecular level in Moroccan and Ashkenazi Jews.* **Roitberg-Tambur A, Witt CS, Friedmann A, Safirman C, Sherman L, Battat S, Nelken D, Brautbar C.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 1995, Vol. 46, pp. 104-110.
190. *Molecular analysis of HLA class II polymorphisms among different ethnic groups in Israel.* **Amar A, Kwon OJ, Motro U, Witt CS, Bonne-Tamir B, Gabison R, Brautbar C.** 8, s.l. : Human Immunology, 1999, Vol. 60, pp. 723-730.

191. *HLA-DRB and -DQB1 polymorphism in the Macedonian population.* **Hristova-Dimceva A, Verduijn W, Schipper RF, Schreuder GM.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 2000, Vol. 55, pp. 53-56.
192. *HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 alleles and haplotypes frequencies in Iranian healthy adult responders and non-responders to recombinant hepatitis B vaccine.* **Amirzargar AA, Mohseni N, Shokrgozar MA, Arjang Z, Ahmadi N, Yousefi Behzadi M, Amanzadeh A, Shokri F.** 2, s.l. : Iranian Journal of Immunology, 2008, Vol. 5, pp. 92-99.
193. *HLA-genetic diversity among population of Russia and FIS. II. Nations of European Part.* **Boldyreva, M. N. Gus kova, I. A. Bogatova, O. V. Yankevich, T. E. Khromova, N. A. Tegako, O. V. Atramentova, L. A. Ischuk, M. V. Dubova, N. A. Ganicheva, L. L.** 4, s.l. : Immunologiya -Moskva-Meditsina-, 2006, Vol. 27, pp. 198-202.
194. *HLA class II polymorphism in autochthonous population of Gorski kotar, Croatia.* **Crnić-Martinović M, Grahovac B, Jeras BV, Ristić S, Sepčić J, Brajenović-Milić B, Peterlin B, Kapović M.** 3, s.l. : Collegium Antropologicum, 2007, Vol. 31, pp. 853-858.
195. *HLA class II polymorphisms in Tunisian patients with dilated cardiomyopathy.* **Mahjoub S, Mehri S, Ghazouani E, Ouarda F, Boussada R, Zaroui A, Mechmeche R, Hammami M, Ben Arab S.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2010, Vol. 75, pp. 679-683.
196. *HLA class II genetic diversity in southern Tunisia and the Mediterranean area.* **Abdennaji Guenounou B, Loueslati BY, Buhler S, Hmida S, Ennafaa H, Khodjet-Elkhil H, Moojat N, Dridi A, Boukef K, Ben Ammar Elgaaied A, Sanchez-Mazas A.** 2, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2006, Vol. 33, pp. 93-103.
197. *HLA class II DNA polymorphism in a Moroccan population from the Souss, Agadir area.* **Izaabel H, Garchon HJ, Caillat-Zucman S, Beurain G, Akhayat O, Bach JF, Sanchez-Mazas A.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 1998, Vol. 51, pp. 106-110.
198. *HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. Relatedness to Spaniards and Basques.* **Arnaiz-Villena A, Benmamar D, Alvarez M, Diaz-Campos N, Varela P, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J.** 4, s.l. : Human Immunology, 1995, Vol. 43, pp. 259-268.
199. *HLA class II allele and haplotype frequencies in Ethiopian Amhara and Oromo populations.* **Fort M, de Stefano GF, Cambon-Thomsen A, Giraldo-Alvarez P, Dugoujon JM, Ohayon E, Scano G, Abbal M.** 4 Pt 1, s.l. : Tissue Antigens, 1998, Vol. 51, pp. 327-336.
200. *Variation of HLA class II genes in the Nganasan and Ket, two aboriginal Siberian populations.* **Uinuk-Ool TS, Takezaki N, Derbeneva OA, Volodko NV, Sukernik RI.** 1, s.l. : European Journal of Immunogenetics, 2004, Vol. 31, pp. 43-51.
201. *HLA class II molecular polymorphisms in healthy Slavic individuals from North-Western Russia.* **Kapustin S, Lyschov A, Alexandrova J, Imyanitov E, Blinov M.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 1999, Vol. 54, pp. 517-520.

202. *Origin and affinities of indigenous Siberian populations as revealed by HLA class II gene frequencies.* **Uinuk-Ool TS, Takezaki N, Sukernik RI, Nagl S, Klein J.** 3, s.l. : Human Genetics, 2002, Vol. 110, pp. 209-226.
203. *Evolution of Pacific/Asian populations inferred from HLA class II allele frequency distributions.* **Mack SJ, Bugawan TL, Moonsamy PV, Erlich JA, Trachtenberg EA, Paik YK, Begovich AB, Saha N, Beck HP, Stoneking M, Erlich HA.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2000, Vol. 55, pp. 383-400.
204. *Human leucocyte antigen class II DRB1 and DQB1 associations in human immunodeficiency virus-infected patients of Mumbai, India.* **Shankarkumar U, Pawar A, Ghosh K, Bajpai S, Pazare A.** 3, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2010, Vol. 37, pp. 199-204.
205. *Genetic affinities of north and northeastern populations of India: inference from HLA-based study.* **Agrawal S, Srivastava SK, Borkar M, Chaudhuri TK.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2008, Vol. 72, pp. 120-130.
206. *Human genetic variation studies and HLA class II loci.* **Agrawal S, Khan F, Bharadwaj U.** 4, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2007, Vol. 34, pp. 247-252.
207. *DNA typing of HLA class II genes (HLA-DR, -DQ and -DP) in Japanese patients with histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi's disease).* **Tanaka T, Ohmori M, Yasunaga S, Ohshima K, Kikuchi M, Sasazuki T.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 1999, Vol. 54, pp. 246-253.
208. *Gene frequencies and haplotypic associations within the HLA region in 916 unrelated Japanese individuals.* **Hashimoto M, Kinoshita T, Yamasaki M, Tanaka H, Imanishi T, Ihara H, Ichikawa Y, Fukunishi T.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 1994, Vol. 44, pp. 166-173.
209. *HLA class I (A, B, C) and class II (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1) alleles and haplotypes in the Han from southern China.* **Trachtenberg E, Vinson M, Hayes E, Hsu YM, Houtchens K, Erlich H, Klitz W, Hsia Y, Hollenbach J.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2007, Vol. 70, pp. 455-463.
210. *HLA class II allele and haplotype frequencies in Koreans based on 107 families.* **Song EY, Park MH, Kang SJ, Park HJ, Kim BC, Tokunaga K, Akaza T, Juji T.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2002, Vol. 59, pp. 475-486.
211. *Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population.* **Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2000, Vol. 56, pp. 522-529.
212. *HLA class II alleles in Ainu living in Hidaka District, Hokkaido, northern Japan.* **Bannai M, Tokunaga K, Imanishi T, Harihara S, Fujisawa K, Juji T, Omoto K.** 1, s.l. : American Journal of Physical Anthropology, 1996, Vol. 101, pp. 1-9.
213. *Towards understanding the origin and dispersal of Austronesians in the Solomon Sea: HLA class II polymorphism in eight distinct populations of Asia-Oceania.* **Zimdahl H, Schiefenhövel W,**

**Kayser M, Roewer L, Nagy M.** 6, s.l. : European Journal of Immunogenetics, 1999, Vol. 26, pp. 405-416.

214. *HLA-DR and -DQB1 DNA polymorphisms in a Vietnamese Kinh population from Hanoi.* **Vu-Trieu A, Djoulah S, Tran-Thi C, Ngyuyen-Thanh T, Le Monnier De Gouville I, Hors J, Sanchez-Mazas A.** 5, s.l. : European Journal of Immunogenetics, 1997, Vol. 24, pp. 345-356.

215. *HLA-DRB1 and DQB1 allele distribution in the Muong population exposed to malaria in Vietnam.* **Busson M, Vu Trieu A, Labelle P, Pham-Van K, Ho-Quang H, Bouteiller AM, Bleux H, Charron D, Hors J.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 2002, Vol. 59, pp. 470-474.

216. *Major histocompatibility complex class II alleles in Kazak and Han populations in the Silk Route of northwestern China.* **Mizuki M, Ohno S, Ando H, Sato T, Imanishi T, Gojobori T, Ishihara M, Ota M, Geng Z, Geng L, Li G, Kimura M, Inoko H.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 1997, Vol. 50, pp. 527-534.

217. **Xu, A.** s.l. : Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop, 2006, p. 175.

218. *HLA-genetic diversity among populations of Russia and FSU. I.* **Boldyreva MN, Alexeev LP, Khaitov RM, Gouskova IA, Bogatova OV, Yankevich TE, Khromova NA, Balanovskaya EV, Balanovsky OP, Pshenichnov AS, Tcelenskaya IN, Kashenin MN, Ganicheva LL, Pozdeeva OS, Evseeva IV, Saroyants LV.** 5, s.l. : Immunologiya -Moskva- Meditsina-, 2005, Vol. 26, pp. 260-263.

219. **Trejaut, J.** s.l. : Proceedings of the 12th International Histocompatibility Workshop, 1997, Vol. 2, p. 197.

220. *HLA class II gene polymorphism in Parsees and Zoroastrians of Iran.* **Farjadian S, Moqadam FA, Ghaderi A.** 3, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2006, Vol. 33, pp. 185-191.

221. *HLA class I and class II allele distribution in the Bubi population from the island of Bioko (Equatorial Guinea).* **de Pablo R, García-Pacheco JM, Vilches C, Moreno ME, Sanz L, Rementería MC, Puente S, Kreisler M.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 1997, Vol. 50, pp. 593-601.

222. *HLA class II similarities in Iranian Kurds and Azeris.* **Farjadian S, Ghaderi A.** 6, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2007, Vol. 34, pp. 457-463.

223. *HLA class II polymorphism in Aka Pygmies and Bantu Congolese and a reassessment of HLA-DRB1 African diversity.* **Renquin J, Sanchez-Mazas A, Halle L, Rivalland S, Jaeger G, Mbayo K, Bianchi F, Kaplan C.** 4, s.l. : Tissue Antigens, 2001, Vol. 58, pp. 211-222.

224. *HLA class II polymorphism in a Gabonese Banzabi population.* **Migot-Nabias F, Fajardy I, Danze PM, Everaere S, Mayombo J, Minh TN, Renaut A, Georges AJ.** 6, s.l. : Tissue Antigens, 1999, Vol. 53, pp. 580-585.

225. *Molecular analysis of HLA polymorphism in Khoton-Mongolians*. **Munkhbat B, Sato T, Hagihara M, Sato K, Kimura A, Munkhtuvshin N, Tsuji K.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 1997, Vol. 50, pp. 124-134.
226. *HLA-DPB1, -DRB1, and -DQB1 polymorphism defined in Ewenki ethnic minority of China Inner Mongolia Autonomous Region*. **Su X, Bi L, Hai R, Qimuge S, Ying M, Bahring S, Gong M.** 6, s.l. : International Journal of Immunogenetics, 2007, Vol. 34, pp. 435-440.
227. *Polymorphism of human leukocyte antigen-DRB1, -DQB1, and -DPB1 genes of Shandong Han population in China*. **Zhou L, Lin B, Xie Y, Liu Z, Yan W, Xu A.** 1, s.l. : Tissue Antigens, 2005, Vol. 66, pp. 37-43.
228. *Major histocompatibility complex class II alleles in an Uygur population in the Silk Route of Northwest China*. **Mizuki N, Ohno S, Ando H, Sato T, Imanishi T, Gojobori T, Ishihara M, Goto K, Ota M, Geng Z, Geng L, Li G, Inoko H.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 1998, Vol. 51, pp. 287-292.
229. *Multiple sclerosis in Gypsies from southern Spain: prevalence, mitochondrial DNA haplogroups and HLA class II association*. **Fernández O, Fernández V, Martínez-Cabrera V, Mayorga C, Alonso A, León A, Arnal C, Hens M, Luque G, de Ramón E, Caballero A, Leyva L.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2008, Vol. 71, pp. 426-433.
230. *Characteristics of HLA class I and class II polymorphisms in Rwandan women*. **Tang J, Naik E, Costello C, Karita E, Rivers C, Allen S, Kaslow RA.** 4, s.l. : Experimental & Clinical Immunogenetics, 2000, Vol. 17, pp. 185-198.
231. *HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 polymorphism in the Naxi ethnic group of South-western China*. **Fu Y, Liu Z, Lin J, Jia Z, Chen W, Pan D, Liu Y, Zhu Y, Chen R, Xu A.** 2, s.l. : Tissue Antigens, 2003, Vol. 61, pp. 179-183.
232. *Polymorphism of HLA-DRB1, -DQB1 and -DPB1 genes in Bai ethnic group in southwestern China*. **Hu W, Tang L, Wang J, Wang B, Li S, Yu H, Tang W, Li H, Tan S, Shou W, Xiao C.** 5, s.l. : Tissue Antigens, 2008, Vol. 72, pp. 474-477.
233. *HLA class I variation in the West African Pygmies and their genetic relationship with other African populations*. **Bruges Armas J, Destro-Bisol G, López-Vazquez A, Couto AR, Spedini G, Gonzalez S, Battaglia C, Peixoto MJ, Martinez-Borra J, López-Larrea C.** 3, s.l. : Tissue Antigens, 2003, Vol. 62, pp. 233-242.
234. *The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation*. **International HIV, Controllers Study.** 6010, s.l. : Science, 2010, Vol. 330, pp. 1551-1557.
235. **(BMDW), Bone Marrow Donors Worldwide.** Annual Report. General Information Documents. *Bone Marrow Donors Worldwide*. [Online] Agosto 10, 2012. [Cited: Octubre 14, 2012.] <http://www.bmdw.org/uploads/media/BMDW2011.pdf>.

236. *HLA, immunogenetics, pharmacogenetics and personalized medicine*. **Charron, D.** s.l. : International Society of Blood Transfusion, 2011, Vox Sanguinis, Vol. 100, pp. 163–166.

237. *HLA-A, -B, -DR en receptores de trasplante de médula ósea en Uruguay*. **Bengochea M, Álvarez I, Hidalgo PC, Cabrera A, Senatore O, Toledo R et al.** s.l. : Revista Médica Uruguay, 2003, Vol. 19, pp. 149-158.

## 13. ANEXOS

---

### 13.1. Extracción de DNA con Kit comercial (Roche®)

1. Colocar 2.0 ml de sangre total y adicionar 6.0 ml de amortiguador de lisis de eritrocitos.
2. Incubar por rotación durante 10 minutos.
3. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos.
4. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón con vortex.
5. Repetir del paso 1 al 4 tres veces
6. Añadir 1.0 ml de amortiguador de lisis de leucocitos y mezclar con vortex.
7. Adicionar 520 µl de amortiguador para precipitar proteínas y mezclar con vortex.
8. Centrifugar a 5000 rpm durante 17 minutos.
9. Recuperar el sobrenadante y dividirlo en 3 tubos limpios tipo Eppendorf.
10. Precipitar con etanol absoluto en relación 1:2 a temperatura ambiente y mezclar cuidadosamente hasta observar el DNA.
11. Centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante.
12. Adicionar 1.5 ml de etanol al 70%
13. Centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante.
14. Secar el DNA por 30 minutos.
15. Adicionar 100 µl de agua estéril y mezclar ligeramente con vortex.
16. Leer el espectrofotómetro a 260 y 280 nm, para obtener la concentración y pureza del DNA.

### **13.2. Procedimiento para realizar la técnica PCR-SSO**

1. Extraer el DNA, con la cantidad apropiada de pureza ( $A_{260/280} > 1.6$ ).
2. Preparar la mezcla de reacción (Master mix) para cada par de iniciadores específicos de locus que se va a llevar a cabo. En la PCR-SSO, uno de los iniciadores puede estar marcado con una molécula ligadora, como la biotina, por lo que la unión del producto amplificado (amplicón) de DNA puede ser detectada por la adición del complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano.
3. Amplificar la mezcla de reacción en el termociclador.
4. Transferir el amplicón directamente a la membrana de nitrocelulosa que contiene las sondas de oligonucleótidos inmovilizadas.
5. Hibridar el DNA de la muestra marcado con la sonda de oligonucleótido. La temperatura de hibridación depende del tamaño y composición de la sonda.
6. Lavar la membrana con amortiguador astringente para remover los amplicones que no se unieron a las sondas.
7. Desarrollar la reacción química de acuerdo a las sustancias químicas unidas a las hebras de DNA. Los dos sistemas de detección más común son por enzimas que producen color y componentes quimioluminiscentes. Asumiendo que los iniciadores de amplificación son marcados con biotina, el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano, y su sustrato apropiado, producirán una reacción de color visible.
8. Analizar e interpretar los resultados. Los resultados de PCR-SSO, como cualquier otro ensayo de tipificación de HLA, se basa en el patrón de diferenciación. Debido al gran número de sondas utilizadas en la tipificación de PCR-SSO, el análisis es asistido por un programa de computación.

### **13.3. Procedimiento para realizar la técnica PCR-SSP**

#### **Requisitos de la muestra:**

- Muestra de DNA en agua estéril con una concentración de 75-125 ng/μl de DNA.
- El DNA aislado de muestras de sangre total debe recolectarse en tubos con anticoagulante con EDTA o ACD. No use muestras heparinizadas. La heparina puede inhibir la amplificación del DNA (inhibe la acción de la enzima TaqDNA Polimerasa).

#### **Programa del termociclador para el método PCR-SSP**

Paso 1	1 minuto a 96°C
Paso 2, 5 ciclos de	96°C 25 segundos 70°C 50 segundos 72°C 45 segundos
Paso 3, 21 ciclos de	96°C 25 segundos 65°C 50 segundos 72°C 45 segundos
Paso 4, 4 ciclos de	96°C 25 segundos 55°C 60 segundos 72°C 120 segundos
Enfriar	4°C 15 minutos.

#### **Procedimiento PCR-SSP**

1. Descongelar el buffer de PCR congelado (un vial para cada prueba).
2. Retirar una placa de reacción del congelador, y entibiar a temperatura ambiente, cuidando de no dispersar el aceite de parafina mientras se corta o retira el sello adhesivo de la placa de reacción.
3. Retirar la Taq DNA Polimerasa del congelador de -20°C y manténgala fría durante la configuración.

4. Añadir al vial de buffer para PCR, 268µL de agua y 9.3µL de Taq DNA Polimerasa para la tipificación de los *loci* A/B/DR/DQ (placa completa para una sola prueba) o 120 µL de agua mas 4.8 µL de Taq DNA Polimerasa (en caso de determinar dos *loci* por placa, como DR/DQ) y mezclar con vortex.
5. Retirar 8 µl de esta mezcla y añadir al pozo de control de contaminación de la tipificación individual. El pozo de control de contaminación es el último pozo de cada grupo de mezcla de iniciadores de la placa de reacción.
6. Añadir 80 µL de muestra de DNA (a una concentración de 75-125 ng/µl) a la mezcla restante del tubo de PCR y mezclar con vortex.
7. Dispensar 8 µL en cada uno de los pozos restantes. Evitar que la punta de la pipeta entre en contacto con el contenido del pozo.
8. Sellar la placa y someter al ciclado térmico para realizar la PCR.

#### **Interpretación HLA:**

1. Posterior a realizar la electroforesis correspondiente, examinar el gel y determinar las líneas positivas.

Cada línea del gel, con una muestra cargada, muestra una banda de control excepto el pozo de control de contaminación.

La banda de control puede o no amplificar con eficiencia cuando hay un producto específico debido a competencia de sustrato. Los *primers* de control están presentes en concentraciones inferiores para favorecer la reacción del alelo específico.

2. La ausencia de bandas de control sin amplificación específica indica la existencia de reacciones fallidas. Si se pueden determinar los alelos en presencia de una reacción PCR fallida, y la reacción fallida no cambia la asignación del alelo, no necesita repetir la prueba.

Si hay bandas débiles de tamaño incorrecto de productos, no tomarlas en cuenta si la concentración total y la claridad de la amplificación es buena.

Los *primers* no usados formarán una banda difusa por debajo de los 50 pares de base.

3. Varios pozos tienen dos o más tamaños posibles de productos PCR, dependiendo del alelo presente. Consultar la tabla de especificidad de la mezcla del primer para obtener más información sobre la asignación del alelo.

Se recomienda el uso de la tabla de especificidades de las mezclas de iniciadores y la lista de ambigüedades suministradas con cada kit para obtener información más detallada sobre la resolución.

Las reacciones falsas negativas pueden deberse a una amplificación ineficiente, mala calidad del DNA, colocación desigual de la placa en el bloque, variaciones de temperatura a través de los pocillos del propio termociclador o calibración inadecuada del termociclador.

4. Si la mezcla negativa amortiguador/Taq se añadió según las instrucciones, cualquier banda en esta línea es evidencia de contaminación y los resultados de la prueba no son válidos.
5. Confirmar el tamaño aproximado del producto utilizando el formulario de documentación del gel o la hoja de trabajo.
6. Asignar la elección del segundo alelo si se necesita continuando el escaneo de los alelos restantes como se indica anteriormente.
7. Todas las líneas requeridas para un alelo particular deben ser positivas para asignar específicamente un alelo.

### **13.4. Electroforesis en gel de agarosa.**

1. Preparar el agarosa al 2% (2 g en 100 ml de TBE 1X ó 0.5X) para observar productos de PCR.
  2. Calentar la mezcla hasta disolución.
  3. Enfriar la mezcla a 60°C y agregar 2 µl de Bromuro de etidio por cada 100 ml de la mezcla de agarosa.
  4. Montar la cámara de corrimiento electroforético y añadir la agarosa. Evitar la formación de burbujas.
  5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
  6. Colocar el molde con el gel en la cámara de corrimiento electroforético, que contenga TBE a la misma concentración del TBE con el cual se preparó el gel.
  7. Colocar el de marcador de peso molecular en el pozo correspondiente para luego agregar la muestra de acuerdo al número de pozo indicado.
  8. Programar la electroforesis a 150 mV durante 23 minutos.
  9. Al término del corrimiento se observa el gel en un transiluminador UV y se realiza la fotodocumentación del gel.
- \*<sup>1</sup> Para preparar 1 litro de TBE al 10% ó 10 X: 108 g de Tris Base (Concentración final de 890 mM) más 55 g de ácido bórico (Concentración final de 890 mM) y 40 ml de EDTA-disódico a 0.5 M con un pH de 8, dH<sub>2</sub>O c.b.p. para 1000 ml.
- \*<sup>2</sup> El uso de guantes, gafas de seguridad y cubrebocas es indispensable al manejar el Bromuro de etidio, ya que es altamente cancerígeno. El Bromuro de etidio debe estar en una concentración de 10mg/ml.