

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**RELACIONES ENTRE CRETENSES Y OTROS PUEBLOS  
MEDITERRÁNEOS SEGÚN LOS GENES HLA Y LAS  
CULTURAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Eduardo Gómez-Casado**

Bajo la dirección de los doctores:  
Antonio Arnáiz Villena y Jorge Martínez Laso

**Madrid, 2002**

**ISBN: 978-84-669-3020-8**

# TESIS DOCTORAL



## RELACIONES ENTRE CRETENSES Y OTROS PUEBLOS MEDITERRÁNEOS SEGÚN LOS GENES HLA Y LAS CULTURAS

**AUTOR:** Eduardo Gómez Casado

**DIRECTORES:** Prof. Dr. Antonio Arnáiz Villena

Catedrático y Jefe de Servicio de Inmunología, Hospital  
12 de Octubre, Universidad Complutense de Madrid.

**Prof. Dr. Jorge Martínez Laso**

Adjunto del Servicio de Inmunología, Hospital 12 de Octubre.  
Profesor asociado, Universidad Complutense de Madrid.

**LUGAR DE**

**REALIZACION:** Servicio de Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Universidad  
Complutense, Madrid

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**2001**

Don **Antonio Arnáiz Villena**, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Inmunología de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre, y Don **Jorge Martínez Laso**, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, Profesor asociado de Inmunología de la Universidad Complutense de Madrid y Adjunto del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid

CERTIFICAN: Que Don Eduardo Gómez Casado ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "**Relaciones entre cretenses y otros pueblos mediterráneos según los genes HLA y las culturas**".

Revisado el presente trabajo, consideramos que tiene la debida calidad para su defensa y calificación.

Prof. Dr. Antonio Arnáiz Villena

Prof. Dr. Jorge Martínez Laso

# *Dedicatoria*

*A David y Sara*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer constar mi gratitud a los Profesores Dr. Antonio Arnáiz Villena y Dr. Jorge Martínez Laso, por su ayuda no sólo en este trabajo sino en todos los realizados, por transmitirme la pasión por la genética comparada de poblaciones y la inmunología en general, y también por iniciarme en el gran mundo de la ciencia.

Quiero mostrar mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. José Gavilanes Blanco, director del departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, por su ayuda y colaboración en la presentación de esta tesis doctoral.

Al Prof. Dr. Polibios Illiakis, Jefe de Servicio de Hematología del Hospital de Iraklio (Creta), porque su ayuda ha resultado indispensable en la selección de individuos y recopilación de muestras para su estudio.

A todos los componentes, presentes y pasados, del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre, por el apoyo y la colaboración prestados durante la realización del presente trabajo.

Gracias a mi madre, mis hermanos Carlos y Carolina, y a toda mi familia que siempre han estado a mi lado apoyándome.

Por último, de forma más especial a María del Mar, David y Sara, quienes resignados al tiempo arrebatado me han animado y apoyado en los momentos buenos y, sobre todo, en los malos.

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>I. EL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO (HLA)</b> .....	<b>2</b>
1. Generalidades .....	2
2. Localización y estructura.....	3
2.1. Región de clase I.....	3
2.1.1. Genes HLA de clase I "clásicos" o Ia.....	4
2.1.2. Genes HLA de clase I "no clásicos" o Ib.....	4
2.1.3. Pseudogenes .....	4
2.1.4. Genes truncados .....	4
2.1.5. Segmentos génicos .....	5
2.1.6. Genes no HLA que se encuentran dentro de la región de clase I .....	5
2.2 Región de clase II.....	5
2.3 Región de clase III .....	5
3. Genes similares a clase I codificados fuera del sistema HLA .....	6
4. Mapa genético del sistema HLA .....	6
5. Estructura de los antígenos HLA de clase I.....	8
5.1. Estructura proteica de los antígenos HLA de clase I clásicos.....	8
5.2. Estructura génica de los antígenos HLA de clase I clásicos .....	12
5.3. Estructura de los antígenos HLA de clase I no clásicos .....	13
5.4. Regiones reguladoras de los loci de clase I.....	15
6. Estructura de los antígenos HLA de clase II .....	18
6.1. Estructura proteica de los antígenos HLA de clase II.....	18
6.2. Región de genes HLA de clase II .....	19
6.2.1. Subregión-DP .....	19
6.2.2. Subregión-DQ .....	20
6.2.3. Subregión-DR.....	20
6.2.4. Otros genes de clase II.....	20
6.3. Estructura génica de los antígenos HLA de clase II .....	23
6.4. Regiones reguladoras de los genes de clase II .....	23
7. Función de las moléculas HLA .....	25
7.1. Presentación antigénica de las moléculas HLA de clase I.....	25
7.2. Presentación antigénica de las moléculas HLA de clase II.....	28
7.3. Selección del repertorio de linfocitos T .....	29
8. Características del sistema HLA.....	29
8.1. Polimorfismo del sistema HLA.....	29
8.1.1. Polimorfismo serológico.....	29
8.1.2. Polimorfismo genético.....	30
8.1.3. Nomenclatura .....	34
8.1.4. Implicaciones funcionales y evolutivas del polimorfismo HLA .....	34
8.2. Desequilibrio de ligamiento del sistema HLA .....	35
8.2.1. Definición de haplotipo .....	35

8.2.2. Desequilibrio de ligamiento .....	35
8.2.3. Parámetros que miden el desequilibrio de ligamiento.....	36
8.2.4. Origen del desequilibrio de ligamiento .....	36
9. Aplicaciones al estudio del sistema HLA.....	37
10. El sistema HLA y la genética comparada de poblaciones.....	37
<b>II. ANTECEDENTES ANTROPOLÓGICOS, ARQUEOLÓGICOS E HISTÓRICOS DE CRETA .....</b>	<b>39</b>
1. La isla de Creta.....	39
2. Antropología.....	39
3. La civilización minoica .....	40
4. Los pre-micénicos: fin del imperio cretense.....	44
5. Historia contemporánea.....	45
6. Antecedentes genéticos y culturales al presente estudio .....	46
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
1. Población estudiada.....	50
1.1. Selección de individuos .....	50
1.2. Recogida de muestras .....	50
2. Extracción de DNA genómico.....	50
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	50
3.1. Oligonucleótidos sintéticos.....	52
3.1.1. Síntesis de oligonucleótidos .....	52
3.1.2. Purificación de oligonucleótidos .....	53
3.1.3. Precipitación de oligonucleótidos.....	53
3.1.4. Medición espectrofotométrica de oligonucleótidos.....	53
3.1.5. Oligonucleótidos empleados .....	53
4. Amplificación y oligotipaje de los loci HLA de clase I .....	53
4.1. Amplificación de los loci HLA de clase I.....	53
4.1.1. Locus HLA-A.....	53
4.1.2. Locus HLA-B .....	53
4.1.3. Reacciones de amplificación del DNA.....	54
4.1.4. Controles de amplificación.....	55
4.2. Oligotipaje de los loci HLA de clase I.....	55
4.2.1. Oligonucleótidos empleados .....	55
4.2.2. Marcaje no radiactivo de los oligonucleótidos.....	59
4.2.3. Transferencia del producto de PCR a membranas de nylon.....	59
4.2.4. Hibridación de las membranas de nylon.....	59
4.2.5. Exposición y revelado .....	60
4.2.6. Deshibridación de las membranas .....	60



<b>5. Amplificación y oligotipaje de los loci HLA de clase II</b> .....	60
5.1. Locus HLA-DQA1.....	60
5.2. Loci HLA-DRB y -DQB1.....	60
5.2.1. Amplificación de los loci HLA-DRB y -DQB1.....	61
5.2.2. Controles de amplificación.....	62
5.2.3. Oligotipaje de los loci HLA-DRB y -DQB1.....	62
<b>6. Secuenciación de DNA</b> .....	62
6.1. Secuenciación mediante clonaje.....	62
6.1.1. Purificación de productos de PCR.....	63
6.1.2. Ligado en el vector de clonaje.....	64
6.1.3. Transformación de bacterias competentes.....	65
6.1.4. Selección, confirmación y crecimiento de clones recombinantes.....	65
6.1.5. Purificación de recombinantes.....	65
6.2. Secuenciación directa.....	66
6.3. Reacciones de secuenciación.....	66
6.3.1. Reacciones de secuenciación en el termociclador.....	67
6.3.2. Purificación de las reacciones de secuenciación.....	67
6.4. Desarrollo electroforético de los productos de secuenciación; detección y obtención de las secuencias.....	67
<b>7. Análisis estadístico</b> .....	68
7.1. Cálculo de frecuencias alélicas.....	69
7.2. Poblaciones comparadas.....	69
7.3. Distancias genéticas y dendrogramas.....	69
7.4. Análisis de correspondencia.....	69
7.5. Estimación de haplotipos y desequilibrio de ligamiento.....	69
<b>8. Soluciones empleadas</b> .....	70

## RESULTADOS

<b>1. Alelos del sistema HLA encontrados en la población cretense</b> .....	75
<b>2. Distribución de alelos HLA obtenidos en la población cretense</b> .....	75
2.1. Frecuencias alélicas de los loci HLA de clase I.....	75
2.2. Frecuencias alélicas de los loci HLA de clase II.....	84
<b>3. Análisis filogenéticos</b> .....	88
3.1. Distancias genéticas, dendrogramas y análisis de correspondencia.....	88
3.1.1. Loci HLA-A, -B y -DRB1.....	91
3.1.2. Locus HLA-DRB1.....	91
3.1.3. Loci HLA-DRB1 y -DQB1.....	93
<b>4. Estudio de haplotipos bi-locus en la población cretense</b> .....	104
4.1. Desequilibrio de ligamiento entre alelos de los loci HLA de clase I y II.....	104
4.1.1. Desequilibrio de ligamiento entre alelos de HLA-A y -B.....	104
4.1.2. Desequilibrio de ligamiento entre alelos de HLA-DRB1 y -DQB1.....	106

4.1.3. Desequilibrio de ligamiento entre alelos de HLA-B y -DRB1 .....	108
5. Haplotipos extendidos presentes en la población cretense .....	109
<b>DISCUSIÓN</b>	
1. Relaciones genéticas HLA e históricas entre los mediterráneos .....	109
1.1. Mediterráneos occidentales: íberos y norteafricanos .....	109
1.2. Mediterráneos orientales .....	110
1.2.1. Cretenses, macedonios, libaneses y judíos .....	110
1.2.2. Egipcios, turcos, armenios e iraníes .....	112
1.3. Análisis de haplotipos .....	114
1.4. Exclusión de los griegos entre los mediterráneos .....	117
2. Los griegos y sub-saharianos están genéticamente relacionados .....	119
2.1. Alelos HLA-DRB1 característicos .....	119
2.2. Otros marcadores genéticos .....	121
2.3. El origen de los griegos .....	123
3. Las antiguas lenguas Usko-Mediterráneas .....	124
4. La hipótesis sahariana .....	127
4.1. África: cambios climáticos y expansión sahariana .....	127
4.2. La hipótesis sahariana frente al modelo de difusión démica .....	131
<b>CONCLUSIONES</b> .....	133
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	136
<b>ANEXO I</b>	
Abreviaturas más comunes utilizadas en el texto .....	147
<b>ANEXO II</b>	
Artículos originales que contienen en modo parcial los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral .....	149

# **INTRODUCCIÓN**

# I. EL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO (HLA)

## 1. GENERALIDADES

El Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC, del inglés **M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex) es un conjunto de genes en su mayoría altamente polimórficos, cuyos productos se expresan en la superficie de gran variedad de células y que son responsables de la respuesta inmune "adaptativa". Se considera que estos genes están presentes en todos los vertebrados (*Klein 1986; Humphreys y Reinherz 1994*) y en el hombre recibe el nombre de sistema HLA (del inglés, **H**uman **L**eukocyte **A**ntigen). Fue descubierto en los años 50 en una situación artificial de trasplante de tejidos de un individuo a otro. Las proteínas que codifican estos genes se denominan "moléculas HLA" o "antígenos HLA" que son los que determinan el rechazo o aceptación de un injerto. Así, dos individuos que expresen en sus células las mismas moléculas HLA aceptan tejidos trasplantados uno del otro, e individuos que difieran en estos loci lo rechazaran vigorosamente. Aunque el papel de estas moléculas en el rechazo de trasplantes tiene un considerable interés, la función primordial de las proteínas codificadas por este complejo genético es la presentación antigénica (respuesta inmunológica específica mediada por linfocitos T).

El papel principal de los genes HLA en la respuesta inmune frente a antígenos fue postulada en 1970 cuando se demostró que los linfocitos T antígeno-específicos no reconocían antígenos libres o en forma soluble, sino que reconocían porciones de proteínas antigénicas unidas no covalentemente a las moléculas HLA. Puesto que estas moléculas son proteínas asociadas a membrana, los linfocitos T pueden reconocer antígenos extraños solamente si están unidos a la superficie de otras células. Esta limitación en la activación de los linfocitos T es debida a que interaccionan mejor con otras células que muestran antígenos asociados a moléculas HLA que en forma soluble.

El modelo de asociación del antígeno con la molécula HLA determina el tipo de linfocito T que es estimulado. Así, los antígenos unidos a moléculas HLA de clase I estimulan principalmente linfocitos T CD8<sup>+</sup> y los unidos a moléculas HLA de clase II estimulan principalmente linfocitos T CD4<sup>+</sup>

La forma en que estos genes influyen en la respuesta inmune frente a diferentes antígenos viene determinada por la modulación del repertorio de células T maduras realizada por el MHC. De esta manera, el sistema inmunológico es capaz de diferenciar lo "propio" de lo "no propio" (patógenos) e incluso de lo "propio alterado" (transformación tumoral).

El sistema HLA es dialélico y codominante. Presenta tres características principales:

- \* es poligénico; está constituido por varios genes clasificados en tres regiones.
- \* es muy polimórfico; existen múltiples alelos para cada locus. Los distintos alelos difieren entre sí en la habilidad para unir y presentar con mayor eficacia diferentes antígenos proteicos. Cada individuo puede tener dos alelos diferentes para cada gen, y la mayor parte de los individuos de una población son heterocigotos para cada gen de este sistema.

\* presenta desequilibrio de ligamiento, es decir, diferentes alelos de distintos genes se encuentran en el mismo cromosoma con una frecuencia mayor a la teóricamente esperada en una combinación al azar.

Todas estas propiedades hacen que el MHC sea uno de los sistemas genéticos más complejos y a la vez fascinantes descritos en la naturaleza.

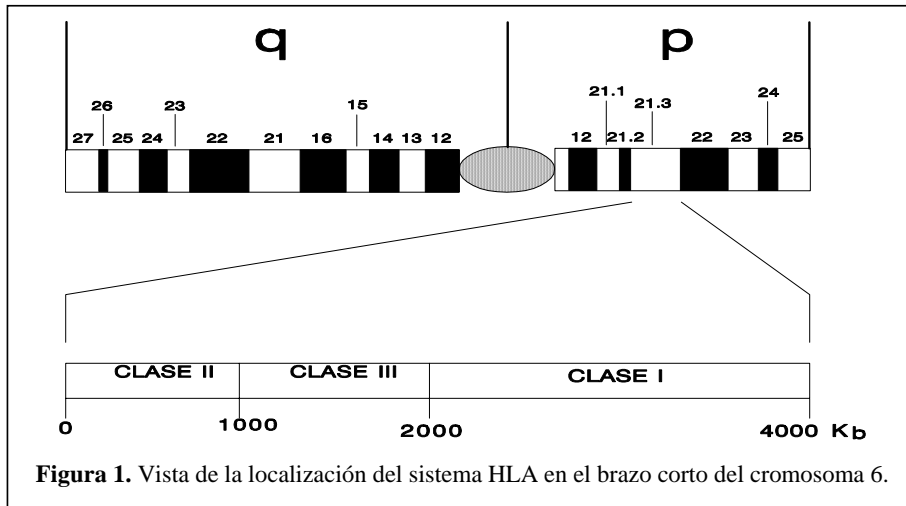
## 2. LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA

El sistema HLA se localiza físicamente en el brazo corto del cromosoma 6, en la parte distal de la banda 6p21.3 y ocupa una longitud de 4 centimorgan (CM), aproximadamente 4 millones de pares de bases (*Ferrando y col. 1981*). En el primer mapa genético completo del sistema HLA se han identificado 224 loci, de los cuales 128 podrían expresarse y el 40% de estos se les supone función inmunológica (*The MHC sequencing consortium 1999*).

Dependiendo del origen genético y/o funcionalidad biológica de sus productos, el conjunto de genes de esta región tradicionalmente se ha dividido en 2-4 grandes grupos (*Klein 1977; Campbell y Trowsdale 1997*). En la actualidad se admiten tres regiones bien definidas, aunque la caracterización funcional y evolutiva de otros genes en esta región no excluye una revisión futura de esta clasificación (Figura 1).

### 2.1. Región de clase I

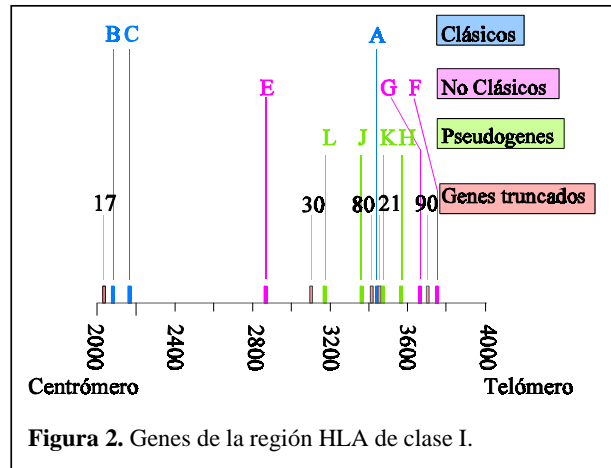
Es la región más telomérica y abarca un segmento cromosómico de unas 1600 Kb. Comprende seis subgrupos de genes cuya nomenclatura está relacionada con el orden cronológico de su descripción, estructura, funcionalidad y patrón de expresión celular. En la figura 2 se esquematiza la localización de



estos genes en la región de clase I.

### 2.1.1. Genes HLA de clase I "clásicos" o Ia:

A este grupo pertenecen los genes HLA-A, -B y -C. Son los primeros descritos dentro del sistema HLA. Codifican para glicoproteínas de membrana que se expresan en prácticamente todas las células del organismo, si bien su nivel de expresión varía desde un máximo en células pertenecientes al sistema inmune (linfocitos T, B y macrófagos) hasta un mínimo en células musculares, del sistema nervioso y fibroblastos. Son moléculas implicadas en la restricción del reconocimiento antigénico mediada por linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>.



### 2.1.2. Genes HLA de clase I "no clásicos" o Ib:

Son HLA-E, -F y -G. Codifican para proteínas estructuralmente similares a las de los genes clásicos. Se diferencian básicamente de los anteriores por su limitada expresión tisular, su menor polimorfismo y su diferente función aún poco conocida.

Además, en la región de clase I se han descubierto toda una serie de secuencias de DNA que según su mayor o menor grado de similitud con genes funcionales se han clasificado en:

### 2.1.3. Pseudogenes:

Los primeros pseudogenes descritos fueron nombrados como HLA-H, -J, -K y -L (*Geraghty y col. 1992a*). Se sitúan en las proximidades de HLA-A, teloméricos o centroméricos a éste. Todos ellos tienen en común la presencia de deleciones que rinden codones de terminación prematuros. Se desconoce si tienen alguna función biológica.

### 2.1.4. Genes truncados:

Son los denominados HLA-16, -75, -80 y -90. Presentan homología con los genes de clase I en zonas extensas (*Geraghty y col., 1992b*). HLA-75 es el único que tiene homología con la región 5'UT (del inglés, UnTranslated) de los genes de clase I; los demás la presentan con la región 3'UT.

#### **2.1.5. Segmentos génicos:**

Son las secuencias más pequeñas y con un menor grado de homología con clase I, el cual se observa en cortas regiones exón/intrón. Aquí se incluyen HLA-17, -21, -30 y -81. HLA-81 mapea fuera del sistema HLA y únicamente presenta homología con el exón 8 y región 3'UT.

#### **2.1.6. Genes no HLA que se encuentran dentro de la región de clase I:**

Existe un grupo de genes que mapean dentro de la denominada región de clase I pero que no tienen ninguna función conocida que los relacione con la presentación antigénica, si bien muchos de ellos podrían ser genes reguladores (*Le Bouteiller 1994*). A este apartado pertenecen los genes OTF3, gen MOG, genes S, gen de la cadena  $\beta$  de la tubulina, genes de la familia P5, genes HSR1, exón B30-2, gen de la prolactina, genes MIC y gen de la hemocromatosis (HFE).

Dentro de este grupo quizás el más interesante sea el gen (HFE). La proteína para la que codifica parece estar implicada en el metabolismo del hierro. Se ha postulado, mediante un análisis de homología de secuencia, que podría tener estructura de molécula de clase I (*Feder y col. 1996*).

## **2.2. Región de clase II**

Es la más centromérica y comprende unas 900 kilobases (Kb). Se divide a su vez en tres subregiones de centrómero a telómero: 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.

Las proteínas para las que codifican estos genes están implicadas en fenómenos de restricción del reconocimiento antigénico mediado por linfocitos T cooperadores CD4+. Su distribución tisular está prácticamente limitada a células del sistema inmune: linfocitos B, macrófagos, linfocitos T activados, etc.

Entre las subregiones -DP y -DQ aparecen otra serie de genes poco conocidos, éstos son -DN, -DO, -DMA y -DMB (*Trowsdale y Kelly 1985; Tonnelie y col. 1985; Kelly y col. 1991a* ). Además, en esta misma zona también se han descrito los genes TAP (TAP1 y TAP2) que codifican para proteínas transportadoras de péptidos (*Trowsdale y col. 1990; Spiess y col. 1990*) y los genes LMP que intervienen en el procesamiento antigénico (*Glynne y col. 1991; Kelly y col. 1991b*).

## **2.3. Región de clase III**

Al menos 36 genes han sido identificados en el fragmento cromosómico que corresponde a esta

región. Estos genes, fuertemente ligados, abarcan un segmento de DNA de unas 100 Kb.

No todos sus genes presentan función inmunológica. Así, esta región incluye factores del complemento de la vía clásica (C4A, C4B, C2) y de la vía alternativa (Bf). También mapean en esta zona los genes A y B de factores de necrosis tumoral (TNF-A y TNF-B), genes para las proteínas inducidas por estrés (HSP70-1 y HSP70-2) y muchos otros, algunos de ellos de función desconocida.

La presencia en esta región de genes sin relación funcional o evolutiva con los antígenos HLA hace que muchos autores no la consideren como perteneciente al Sistema Principal de Histocompatibilidad (*Klein 1990*).

### 3. GENES SIMILARES A CLASE I CODIFICADOS FUERA DEL SISTEMA HLA

Se han descrito recientemente toda una serie de genes con estructura similar, en mayor o menor medida, a los genes de clase I. Los más reseñables son CD1, FcRn, MR1 y  $\alpha 2$  glicoproteína unidora de Zinc. Todos ellos se consideran genes relacionados evolutivamente con los genes HLA.

CD1 y MR1 mapean en el cromosoma 1, al igual que muchos otros genes pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (*Calabi y Milstein 1986; Albertson y col. 1988; Hashimoto y col. 1995*).

La proteína codificada por el gen FcRn (receptor Fc neonatal) se encarga de unir IgG (inmunoglobulina G) procedente de la leche materna ingerida por el recién nacido y transportarla a través del intestino (*Story y col. 1994; Burmeister y col. 1994*). Juega un papel importante en la adquisición pasiva de inmunidad humoral en el neonato. También se ha encontrado en la placenta humana donde se encargaría de transportar IgG.

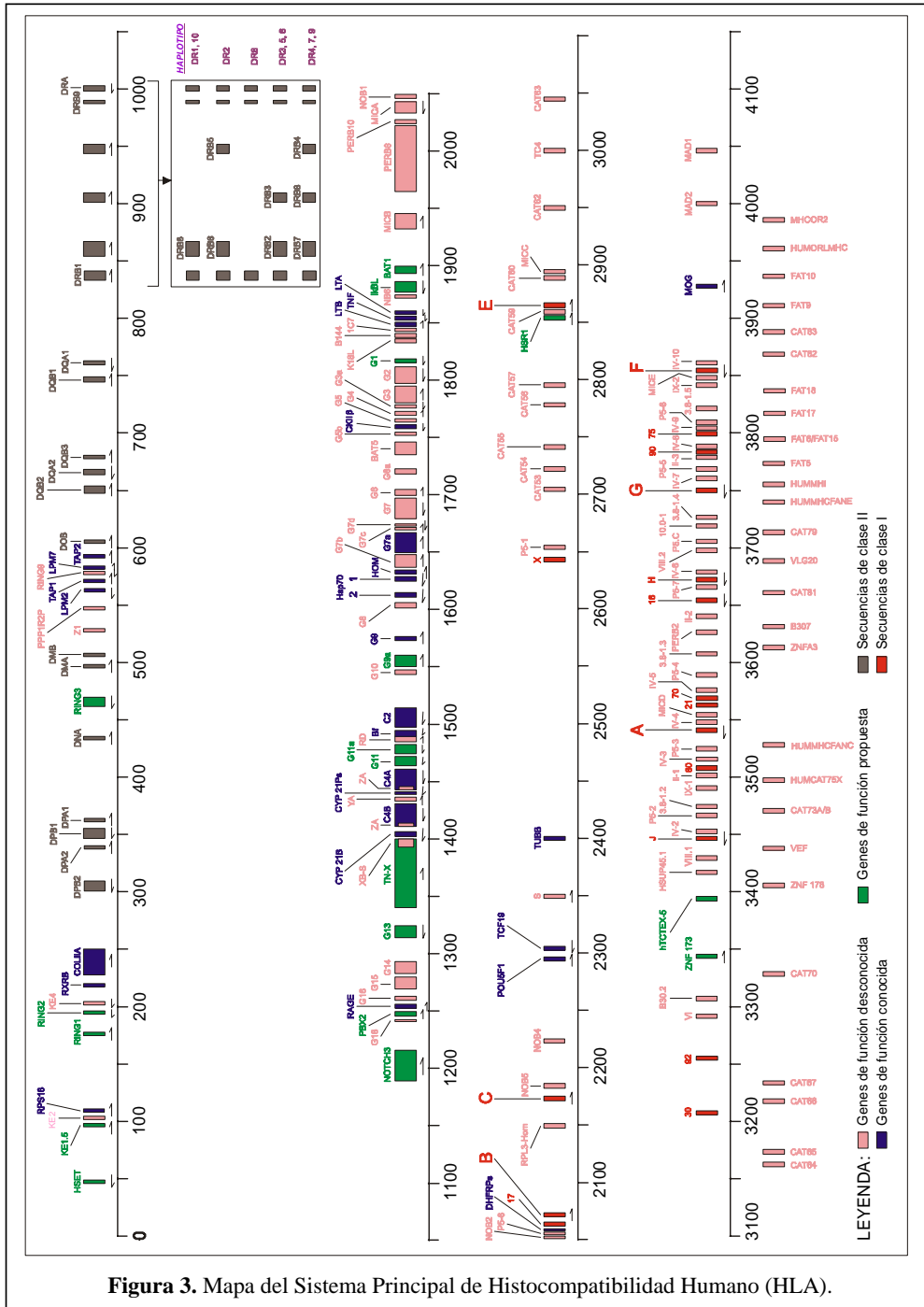
Se ha demostrado hace poco que CD1 es capaz de presentar lípidos y glicolípidos a los linfocitos T  $\alpha/\beta$  (*Beckman y col. 1994; Seiling y col. 1995; Melian y col. 1996*).

Varios científicos han postulado que este grupo de genes podría representar una línea importante de defensa frente a diferentes agentes infecciosos uniendo ligandos no polimórficos de los microorganismos tales como péptidos, carbohidratos, derivados de nucleótidos, lípidos, etc... (*Stroynowski y Forman 1995*).

### 4. MAPA GENÉTICO DEL SISTEMA HLA

La aplicación de técnicas de genética molecular ha permitido determinar la organización física de los loci del complejo HLA. El primer mapa genético completo del sistema HLA se ha dado a conocer recientemente (*The MHC sequencing consortium 1999*) con 224 loci identificados. El mapa genético previo (*Campbell y Trowsdale 1997*) ya constaba de al menos 209 loci correspondientes a genes, pseudogenes y fragmentos génicos (Figura 3).





## 5. ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS HLA DE CLASE I

### 5.1. Estructura proteica de los antígenos HLA de clase I clásicos

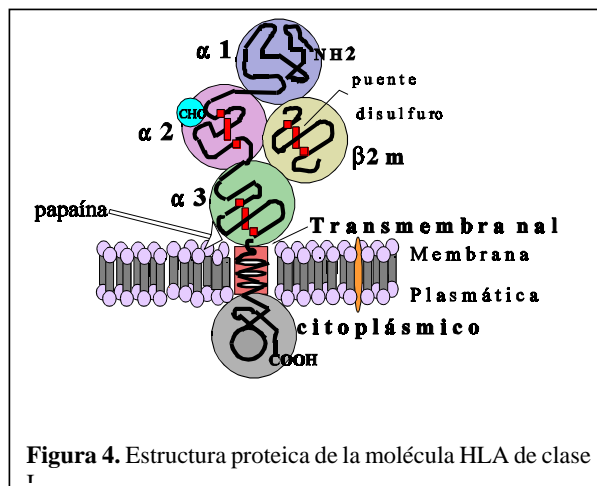
Los antígenos HLA de clase I clásicos (HLA-A, -B y -C) son glicoproteínas de membrana compuestas por dos cadenas polipeptídicas, una cadena pesada  $\alpha$  de unos 44 Kilodalton (Kd) codificada en el sistema HLA y una cadena ligera de 12 Kd, la  $\beta 2$  microglobulina ( $\beta 2$ -m) cuyo gen se encuentra fuera del sistema HLA, concretamente en el cromosoma 15 (*Ploegh y col. 1981*). La cadena pesada es el único miembro del heterodímero que atraviesa la membrana celular y cuyo extremo aminoterminal está orientado hacia el exterior de la célula. Ambas cadenas se unen no covalentemente en su porción extracelular (Figura 4).

La cadena  $\alpha$  está formada por 338 aminoácidos (aas) (HLA-B) o 341 aas (HLA-A y -C). La porción extracelular de esta cadena se divide en tres dominios globulares bien diferenciados de unos 90 aas cada uno, que pueden escindirse de la superficie celular bajo la acción proteolítica de la enzima papaína, denominados: dominio  $\alpha 1$  (aas 1-90, porción N-terminal de la cadena  $\alpha$ ), dominio  $\alpha 2$  (aas 91-182) y dominio  $\alpha 3$  (aas 183-247), codificados cada uno por un exón (*Malissen y col. 1982*). La porción transmembrana, con estructura de  $\alpha$ -hélice, de unos 25 aas, se continúa con un pequeño tallo citoplasmático de 30 aas aproximadamente, rico en tirosinas y serinas.

Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de las cadenas pesadas de las moléculas de clase I son altamente polimórficos a diferencia

de  $\alpha 3$  que está más conservado. El dominio  $\alpha 3$  y la cadena ligera  $\beta 2$ -m presentan alta homología de secuencia y estructura con las regiones constantes de las inmunoglobulinas (*Shrivastava y col. 1985*). Las moléculas de clase I se consideran miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas por tener un origen evolutivo común y por similitudes estructurales, más evidentes en el dominio  $\alpha 3$ . Esta superfamilia también incluye a las moléculas de clase II, al TcR, CD4 y CD8.

En 1987, Bjorkman y colaboradores definieron la primera estructura tridimensional de una proteína HLA, concretamente el antígeno HLA-A2 (*Bjorkman y col. 1987a; Saper y col. 1991*). Posteriormente, se ha conseguido cristalizar varios antígenos más como HLA-Aw68, HLA-B27, HLA-



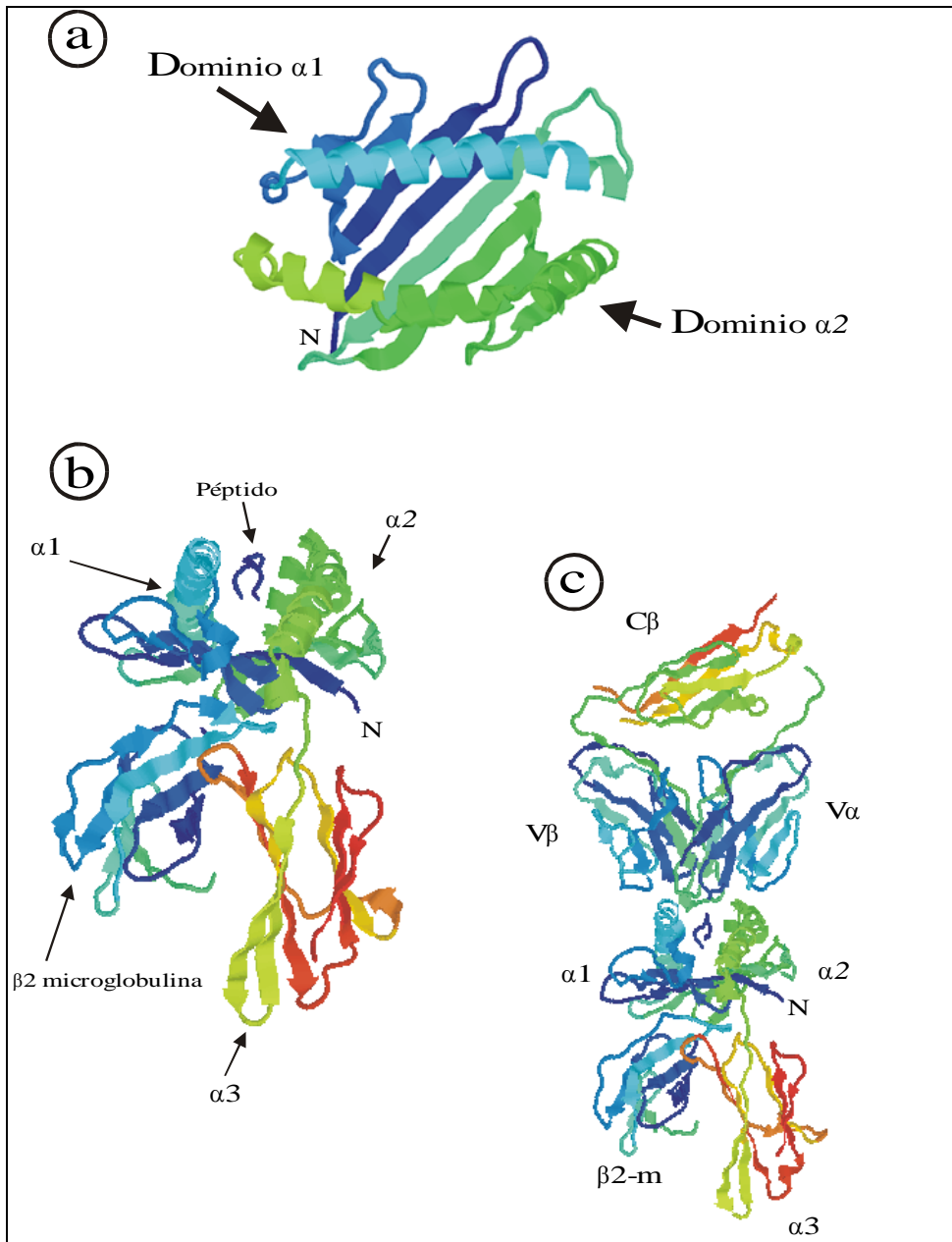
B35 y HLA-B53 (Garrett y col. 1989; Madden y col. 1991; Smith y col. 1996a, b). Todos los cristales obtenidos presentaban una región distal formada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la cadena pesada, y una región proximal a la que pertenecen los dominios  $\alpha 3$  y  $\beta 2$ -m. En la figura 5 se puede ver una representación extrapolada del cristal de clase I: la valva, el heterodímero  $\alpha/\beta 2$ -m con el péptido unido, y la interacción con el receptor de la célula T (TcR). Los dominios distales ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) presentan una estructura compuesta por dos láminas  $\beta$ , formadas cada una por cuatro hebras antiparalelas, y una región de  $\alpha$ -hélice localizada carboxi-terminal de las láminas  $\beta$  (Figura 5). Además el dominio  $\alpha 2$  contiene una hélice corta adicional en posición carboxi-terminal que une los dominios  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Las láminas  $\beta$  de ambos dominios forman la base de una valva flanqueada por las  $\alpha$ -hélices orientadas hacia el exterior. Esta valva formada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de las moléculas de clase I constituye la estructura para la unión de los péptidos procesados (Bjorkman y col. 1987a; Bjorkman y col. 1987b).

El gran polimorfismo que muestran estas moléculas se encuentra concentrado en esta valva. Estos residuos polimórficos sirven para interactuar con los distintos péptidos y/o con el TcR. De los 19 residuos aminoacídicos de alta variabilidad identificados en las moléculas de HLA (Parham y col. 1988), 14 constituyen residuos de posible contacto con el péptido (posiciones 9, 24, 45, 66, 67, 70, 74, 77, 80, 95, 97, 114, 116 y 156), uno contacta con el TcR (posición 65) y cuatro más contactan con el péptido y con el TcR (residuos 62, 69, 76 y 163).

Se establecen toda una serie de contactos intra e interdominios entre  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Aparece un puente salino entre las posiciones 55 de  $\alpha 1$  y 170 del dominio  $\alpha 2$ . Dos puentes disulfuro unen las cisteínas de las posiciones 101 y 164 de  $\alpha 2$  y las posiciones 203 y 259 de  $\alpha 3$ , además de varias interacciones de puentes salinos interdominios (Bjorkman y col. 1987a; Saper y col. 1991; Madden y col. 1992). Todas estas relaciones entre aas contribuyen a la estabilidad de la molécula de clase I en su parte distal. La asparagina en la posición 86 aparece N-glicosilada, si bien esta ramificación no es esencial para el ensamblaje de la molécula ni para su expresión en superficie.

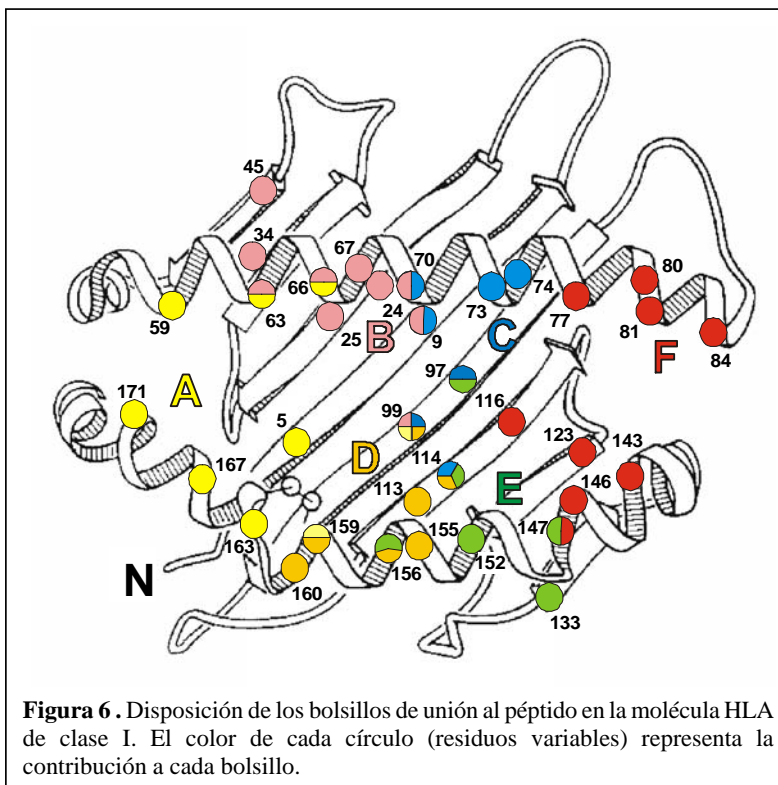
La región proximal a la membrana está formada por el dominio  $\alpha 3$  y la  $\beta 2$ -m y cada uno de ellos, al igual que los dominios constantes de la inmunoglobulinas, consisten en dos láminas  $\beta$  antiparalelas, una formada por 4 hebras y la otra por tres. Las hebras de cada lámina se conectan entre si por puentes disulfuro internos formando una estructura similar a un "sandwich". La  $\beta 2$ -m se sitúa por la parte de abajo de la valva formada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , de tal manera que existe un mínimo contacto entre estos dos dominios y el  $\alpha 3$ . Si los dominios  $\alpha 1/\alpha 2$  interactúan con el péptido y con el TcR reconociendo residuos polimórficos, el dominio  $\alpha 3$  lo hace con el co-receptor de la célula T (CD8), reconociendo determinantes monomórficos en  $\alpha 3$ . La interacción con CD8 requiere la presencia de aas ácidos en las moléculas de clase I, en posiciones 223, 227 y 229, que ocupan una zona localizada en un lazo del dominio  $\alpha 3$ , en una cavidad justo debajo de la valva (Connolly y col. 1990; Salter y col. 1990). A título anecdótico, recientemente se ha demostrado que el dominio  $\alpha 3$  no es imprescindible para el

mantenimiento de la conformación nativa de la valva, al menos en lo que se refiere a su unión al péptido a presentar (*Collins y col. 1995*).



**Figura 5.** Representación tridimensional de la molécula de clase I HLA-A\*0201: a) dominios moleculares de unión a antígeno; b) estructura completa de HLA-A\*0201 con un péptido asociado y la  $\beta 2$ -m; c) la misma estructura anterior interactuando con el TcR (*Bjorkman y col. 1987a; Garboczi y col. 1996*).

La variabilidad que presentan las moléculas de clase I se traduce en cambios topológicos en los sitios de unión a péptido. Las características químicas y la exclusiva configuración de la estructura de cada valva (o Peptide-Binding Groove) explica cómo pueden unir gran variedad de péptidos (*Garrett y col. 1989; Madden y col. 1992*). Saper y colaboradores identificaron una serie de depresiones a lo largo de la valva, son los llamados "Peptide-binding Pockets" o bolsillos (*Saper y col. 1991*). Los péptidos unidos a la valva pueden acomodar una o más de sus cadenas laterales aminoacídicas en estos bolsillos. Se han identificado seis bolsillos denominados con letras de la A a la F, localizados en las uniones de las láminas  $\beta$  con las  $\alpha$ -hélices (bolsillos B, C, D y E) o en los extremos de las dos  $\alpha$ -hélices (bolsillos A y F) (Figura 6). Estos dos últimos contienen aas más conservados que los otros cuatro (*Barber y Parham 1993*). De las 19 posiciones de alta variabilidad identificadas en las proteínas de clase I que interactúan con el péptido y/o con el TcR, 17 están situadas en la valva.



## 5.2. Estructura génica de los antígenos HLA de clase I clásicos

Los genes que codifican para los antígenos HLA-A, -B y -C se han denominado clásicos por ser los primeros en conocerse dentro del sistema HLA, por su gran polimorfismo, por estar implicados en el rechazo de injertos y además por presentar una expresión casi generalizada en las células del organismo.

La cadena  $\alpha$  de las moléculas clásicas o Ia está codificada por un gen constituido por 8 exones (*Malissen y col. 1982; Jordan y col. 1985*), de manera que existe correspondencia exón/dominio estructural, excepto para los dominios citoplasmáticos que están codificados por dos o tres exones (Figura 7). El exón 1 codifica para la región 5' UT no traducida y para un péptido líder de 24 aas, éste contiene un núcleo hidrofóbico característico de las proteínas que migran del retículo endoplasmático. Los exones 2 y 3 son los más polimórficos y codifican respectivamente para los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la molécula, mientras que el exón 4 es menos polimórfico y da lugar al dominio  $\alpha 3$ . Los exones 4 y 5 codifican para el dominio

transmembrana hidrofóbico. El dominio citoplasmático está codificado por los exones 6, 7 y parte del 8 para los genes HLA-A y -C, y por los exones 6 y 7 para HLA-B. En este último, el exón 8 ya codifica para la región 3'UT no traducida. La diferencia en el tamaño del dominio citoplasmático se debe a la situación que ocupa el codón de terminación, estando éste en el exón 8 para HLA-A y -C, y en el exón 7 para -B.

Una característica de los genes HLA de clase I es la homología de secuencias de nucleótidos entre los distintos alelos de la serie HLA-A en su región 3'UT que se diferencia claramente de la de los alelos de las series -B y -C (*Jordan y col. 1985*). Además existen zonas de secuencias conservadas no sólo entre genes clase I humanos sino con los de otras especies, tanto en intrones como en exones, pero que no son locus específicas y a las que se otorga un papel todavía no definido (*Shrivastava y col. 1985*). El análisis de las secuencias conocidas correspondientes a distintos genes de clase I permite diferenciar "zonas variables" y "zonas homólogas". Hasta el 80% de los cambios de base dentro de las primeras rinden cambios de aas, mientras que sólo lo hacen el 35% en las últimas (*Shrivastava y col. 1985*).

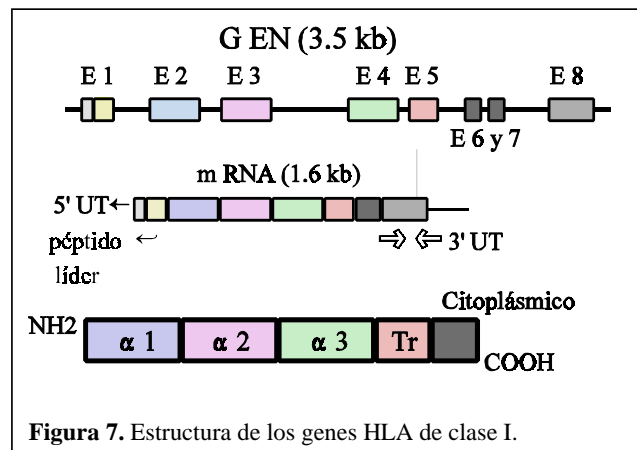


Figura 7. Estructura de los genes HLA de clase I.

### 5.3. Estructura de los antígenos HLA de clase I no clásicos

Se han caracterizado tres genes considerados como no clásicos (Ib) llamados HLA-E (*Shrivastava y col. 1987; Koller y col. 1988*), HLA-F (*Geragthy y col. 1990*) y HLA-G (*Geragthy y col. 1987*). El locus HLA-E dista 550 Kbs de HLA-A y los otros dos están en sus proximidades (ver la Figura 2).

En líneas generales se puede decir que no existen grandes diferencias en cuanto a la organización exón/intrón de estos genes con respecto a los clásicos, aunque poseen una serie de características peculiares que los diferencian de los genes Ia; estas son:

- \* Restringida distribución tisular (-G y -F).
- \* Restringido polimorfismo.
- \* Ausencia, de momento, de una función definida. Aunque este punto cada vez se va aclarando más, sobre todo para -E y -G.

#### HLA-E

Es el más divergente de todos los genes humanos Ib. Los exones 2 y 3 de los genes clásicos se parecen más entre sí que a los de HLA-E, mientras que los exones 4 y 5 de HLA-A son más semejantes a los de -E que a los de -B y -C (*Hughes y Nei 1989*).

HLA-E presenta una delección de cinco nucleótidos en el exón 7 que origina un codón de terminación por lo que su dominio citoplasmático es más corto, con un aa menos que los de los loci HLA-B y cuatro menos que los de los loci -A y -C. Posee tres segmentos repetitivos Alu que no están presentes en otros genes de clase I: el primero aparece en la región 5'UT, el segundo en el intrón 5 y el tercero en la región 3'UT. También presenta variaciones en las señales reguladores que comentaremos posteriormente.

Se ha descrito la presencia de dos transcritos de tamaños 1.8 y 2.7 Kbs que difieren en la extensión de la región 3'UT no traducida, originados por el uso de señales alternativas de poliadenilación, una de las cuales aparece como consecuencia de la inserción Alu en 3'UT (*Ulbrecht y col. 1992*). Sus RNA mensajeros (mRNA) se han visto en todo tipo de tejidos incluyendo tejidos fetales y placentarios (*Wei y Orr 1990; Guillaudeux y col. 1995; Houlihan y col. 1995*); sin embargo, en muchos años no pudo confirmarse la presencia de la proteína en la superficie celular, lo que sugería un mecanismo de regulación postranscripcional que impide su llegada a la membrana.

Recientemente, se ha conseguido cristalizar la molécula de HLA-E formando complejo con un ligando (*O'Callaghan y col. 1998*). El péptido unido (VMAPRTVLL) procede de los residuos altamente conservados 3-11 de la secuencia líder del alelo HLA-B8, y que también comparten HLA-B7, -B14, -B39, -B42 y -B48. Anteriormente se demostró que HLA-E era capaz de unir péptidos de 9 aas con estructura XMXXXXXXL procedentes de fragmentos del péptido líder de otros genes de clase I, excepto de sí mismo, tanto clásicos como de HLA-G (*Braud y col. 1997a*). El análisis cristalográfico de HLA-E



muestra que tiene estructura similar a las moléculas Ia. Sorprendentemente, a pesar de que estos péptidos líder están en el retículo endoplásmico, lugar donde ocurre el ensamblaje de las moléculas de HLA y la unión del péptido antigénico, se ha demostrado que la expresión en superficie de HLA-E es dependiente de la presencia en la célula de proteínas TAP y tapasina (*Braud y col. 1997b*). Tanto TAP como tapasina son unas proteínas implicadas en el procesamiento antigénico, se encargan de introducir los péptidos a presentar al interior del retículo endoplásmico (ver apartado 7.1). Esto implicaría que es necesario que los péptidos líder, sustrato para HLA-E, deben abandonar el retículo y sufrir una fragmentación que origine péptidos de tamaño adecuado, en el citoplasma celular, y posteriormente deben ser introducidos de nuevo. Esta es la vía normal del procesamiento antigénico para todas las moléculas HLA de clase I. La hipótesis funcional sugerida para HLA-E es muy sugerente porque se ha propuesto que se encargaría de inhibir la lisis producida por las NKs, a través del reconocimiento por parte de los receptores NK (de tipo lectina CD94/NKG2A,B y C; *Braud y col. 1998; Borrego y col. 1998; Long 1998*), sobre células normales que expresen HLA-E con el péptido unido. Las células NK lisan las células infectadas por virus que impiden la expresión normal de las moléculas HLA. HLA-E funcionaría como un "negociador-intermediario": si la célula está sana, se sintetizan proteínas HLA, con lo que HLA-E tiene a su disposición péptidos líder para unirlos y poder expresarse en la superficie celular, interactuar con las NKs y producir su inhibición. Si la célula está infectada se interrumpe este proceso mediador ya que HLA-E, al igual que las otras proteínas HLA, es inestable si no tiene un péptido unido, y se produce la lisis celular.

#### **HLA-F**

Al igual que los otros genes no clásicos, HLA-F presenta una organización exón/intrón y tamaño similar a los clásicos. Sin embargo, posee dos características que lo diferencian claramente: la primera de ellas es que elimina por splicing (maduración del mRNA) el exón 7 debido a una mutación puntual en la señal de splicing en 3' del intrón 6, ésta cambia AG (señal normal en el 100% de los casos) por AA no reconocida por la maquinaria de maduración del mRNA. La segunda es que presenta una inusual región 3'UT, exclusiva entre los genes de clase I, que se caracteriza por la inserción de una secuencia altamente conservada durante la evolución y semejante a la de una proteína ribosomal (*Zemmour y Parham 1992*).

#### **HLA-G**

Posee la misma organización exón/intrón que los genes clásicos, con la particularidad de que el segundo triplete del exón 6 es un codón stop, que daría lugar a una proteína con un dominio citoplásmico corto de 6 aa, 5 codificados por el exón 5 y 1 por el exón 6. Se ha propuesto un splicing alternativo del mRNA de HLA-G (*Ishitani y Geraghty 1992*), al haberse detectado no solamente el mRNA de tamaño completo (1200 pb) que codificaría para una proteína (HLA-G1) con un dominio transmembranal intacto y una cola corta (1 aa), sino también otras formas más cortas:

-un mRNA de 900 pb en el que estaría excluido el exón 3, dando lugar a una proteína (HLA-G2)

sin el dominio  $\alpha 2$ . En esta isoforma los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  se encontrarían unidos.

-un mRNA de 600 pb que carecería de los exones 2 y 3 dando lugar a una proteína (HLA-G3) en el que el dominio  $\alpha 1$  estaría directamente conectado a la porción transmembranal.

Se propuso, a partir de estos hallazgos, que HLA-G podría funcionar como forma soluble tras ser escindida de la membrana plasmática por acción proteolítica enzimática, de manera similar a lo que se supone ocurre para las formas solubles de HLA.

Con este modelo se sugiere que las proteínas de HLA-G son en unos casos estructuralmente parecidas a las de clase Ia (HLA-G1), mientras que en el caso de HLA-G2 y -G3 lo serían a las de clase II, al postular la existencia de dímeros, en los que la estructura de "valva" de la molécula se origina por la interacción de 2 dominios  $\alpha 1$  procedentes de dos moléculas de HLA-G diferentes; de manera análoga a lo que ocurre en las moléculas HLA de clase II, en las que interaccionan dos dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de dos cadenas polipeptídicas diferentes para originar la estructura de "valva".

Una cuarta forma de splicing alternativo formaría una proteína sin dominio  $\alpha 3$ , codificado éste por el exón 4 (HLA-G4) (Kirszenbaum y col. 1994).

Otros estudios (Fujii y col. 1994) detectaron la existencia de 2 transcritos alternativos adicionales en los que la pauta de lectura se extiende desde el péptido líder hasta parte del intrón 4, en el que un codón stop eliminaría la porción transmembranal, originando un extremo carboxi-terminal de 21 aa diferente al encontrado en las proteínas de membrana. Esto apoyaría, según estos investigadores, la existencia de 2 formas solubles: HLA-G1 soluble, constituida por los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y la cola de 21 aa codificada en el intrón 4, y HLA-G2 soluble, idéntica a la anterior pero sin dominio  $\alpha 2$ .

#### 5.4. Regiones reguladoras de los loci de clase I

El control de la expresión génica de los loci de clase I se efectúa a través de toda una serie de elementos reguladores situados en la región 5' promotora. Esta región abarca aproximadamente de 150 a 200 pb anteriores al punto de inicio de la transcripción, aunque posiblemente su tamaño sea mucho mayor (Maguire y col. 1992). En ella se han descrito a su vez distintas subregiones a las que se unen proteínas inductoras/represoras de la transcripción.

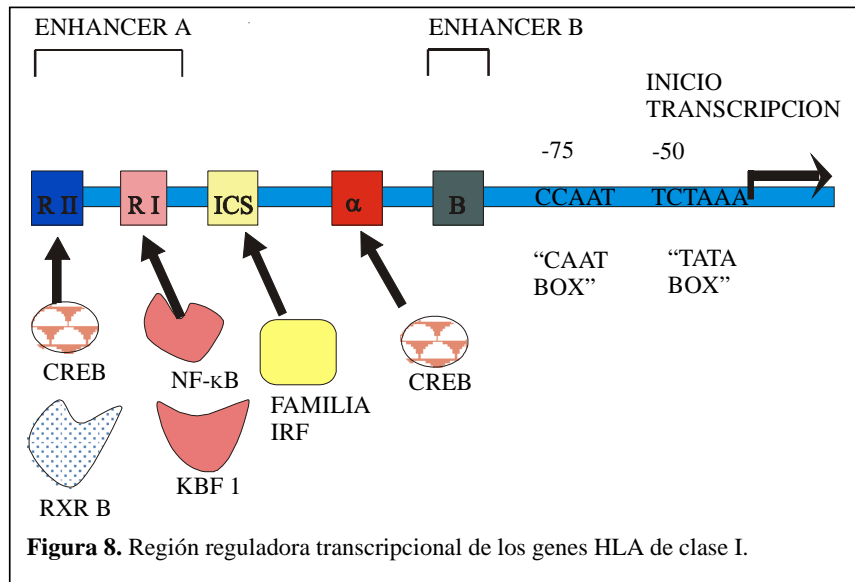
Los elementos reguladores conservados comprenden dos regiones "enhancer", los elementos ICS y  $\alpha$ , y por último las "cajas" CAAT y TATA.

\* **Enhancer A:** abarca dos regiones, la **región I** es un palíndromo de 13 pb que es homólogo al sitio de unión del factor Nf-kB originariamente descubierto en el promotor de los genes de las inmunoglobulinas y más recientemente en otros genes, incluyendo  $\beta 2$ -m, IFN $\beta$ , IL2 y HIV (Ozato 1995). La **región II** parece contener un sitio de respuesta a AMPc y otro de respuesta a los retinoles.

\* **Enhancer B:** (Israel y col. 1987) parece ejercer una inducción más débil que el enhancer A.

Contiene una secuencia conservada de 11 pb aunque se desconoce su significado fisiológico.

\* **ICS** (Secuencia Consenso de Interferón) es homólogo a los denominados elementos de respuesta a interferón (IRE) encontrados en otros genes inducibles por interferón. Como se puede ver en la figura 8 se postula que a través de su secuencia interaccionan toda una familia de factores proteicos

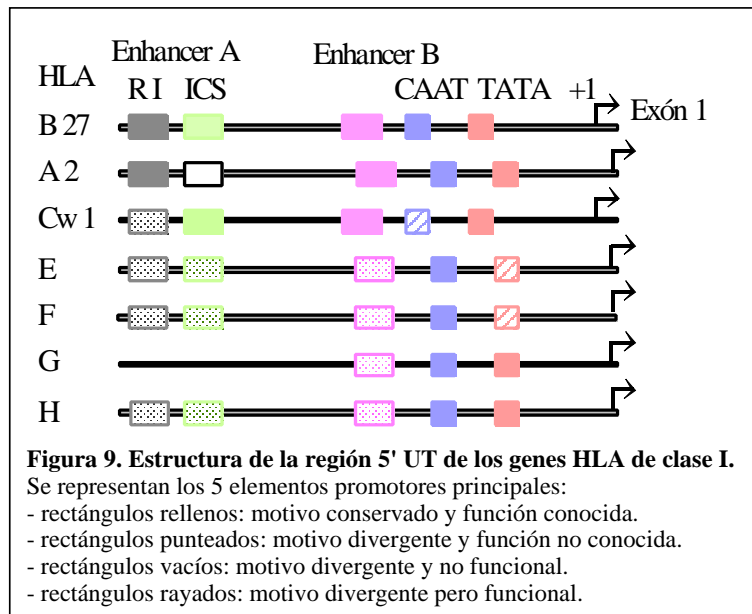


(Interferon Regulatory Factor family) los cuales serían los intermediarios en la acción de los interferones.

\* **CRE:** elemento de respuesta a AMPc, se ha localizado en la región II, como ya se ha mencionado, y también en la región  $\alpha$ . A través de él ejercen su acción algunas hormonas (insulina) y corticoides (hidrocortisona) disminuyendo la expresión de los genes HLA de clase I (*Saji y col. 1992*) en los órganos diana. Con estos elementos interaccionan los CREB (cAMP Response Element Binding factor) o factores de unión.

A parte de estos elementos existen otros que actúan coordinadamente, definiendo enhancers (inductores) y silencers (silenciadores) a través de los cuales se controla la expresión basal e inducible de los genes HLA de clase I, así como el diferente patrón celular y/o tisular de expresión de estos antígenos (*Maguire y col. 1992*); de esta forma se podría explicar por ejemplo el patrón de expresión tan restringido/específico de los antígenos de clase Ib.

El gen de la  $\beta 2$ -m también posee elementos reguladores del mismo tipo, lo que sugiere una coordinación paralela con la de clase I. Otro aspecto interesante de la regulación es que las células tumorales frecuentemente pierden la expresión de las moléculas HLA de clase I (*Blanchet y col. 1992*), motivada por la carencia de determinados factores proteicos (Nf-kB, KBF1), de unión a otra de estas subregiones (Región I), los cuales están también implicados en la regulación.



Por último, mencionar que todos estos elementos poseen entre los distintos loci de clase I un grado de conservación variable lo que repercute en su funcionalidad (*Vallejo y Pease 1995*), como se muestra en la figura 9. Todos los genes transcritos por la RNA polimerasa II, incluyendo los genes HLA de clase I, poseen dos elementos promotores, las cajas TATA y CCAAT, localizadas aproximadamente entre 50 y 75 pb anteriores al codón de iniciación. Todos los loci de clase I, exceptuando HLA-C poseen una CCAAT-box inalterada y situada en similares posiciones.

En cuanto a la TATA-box, a parte de HLA-E y -F que presentan una secuencia TATAAA convencional, todos los loci HLA I presentan una inusual TATA-box (TCTAAA), lo que parece ser una peculiaridad de estos genes humanos (*Geraghty y col. 1992b*).

## 6. ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS HLA DE CLASE II

### 6.1. Estructura proteica de los antígenos HLA de clase II

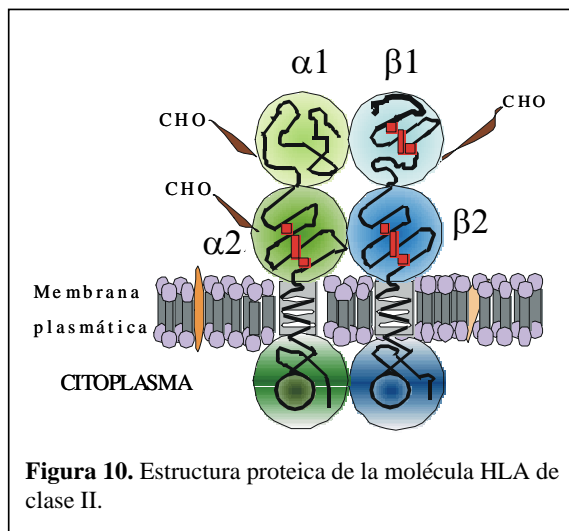
Las moléculas de clase II (HLA-DP, -DQ y -DR) son heterodímeros transmembrana formados por dos cadenas, una cadena  $\alpha$  de 33-35 (Kd) y otra  $\beta$  de 26-28 Kd asociadas no covalentemente. Se orientan de tal manera que sus extremos amino-terminal aparecen fuera de la célula (Figura 10).

Ambas cadenas presentan dos dominios extracelulares de 90 a 100 aas designados como  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ . Los dominios  $\beta 1$  son todos polimórficos y en algún caso los  $\alpha 1$  también (-DQ $\alpha$ , -DP $\alpha$ ). Los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  son homólogos a las regiones constantes de las inmunoglobulinas. Un péptido conector hidrofóbico (10 a 12 aas) une los dominios extracelulares de ambas cadenas a las respectivas porciones transmembrana (20 a 25 aas) y a los segmentos citoplasmáticos (8 a 15 aas) (Kaufman y col. 1984).

Las cadenas  $\alpha$  poseen dos puntos de N-glicosilación, uno en cada dominio extracelular, y un puente disulfuro intradominio en  $\alpha 2$ . A diferencia de ésta, la cadena  $\beta$  posee un único sitio de N-glicosilación en  $\beta 1$  y dos puentes disulfuro intradominio, uno en  $\beta 1$ , que genera un asa de 64 aas, y otro en  $\beta 2$ . Estas modificaciones post-traducción no influyen en el reconocimiento por aloantisueros de estas moléculas de clase II (Shackelford y Strominger 1983).

Intracelularmente, las proteínas de clase II se asocian con un tercer elemento proteico no polimórfico, de 31 Kd, denominado Cadena Invariante (Ii) y codificado fuera del sistema HLA. El complejo Cadena Invariante-dímero  $\alpha/\beta$  se forma durante la biosíntesis y transporte de las moléculas de clase II; sin embargo, se disocian antes de su expresión en la superficie celular (Kvist y col. 1982). Se ha postulado que la Cadena Invariante podría jugar un papel importante en el transporte intracelular de las moléculas de clase II y en la unión del péptido.

Brown y colaboradores (1993), usando técnicas de difracción de rayos X consiguieron determinar la estructura tridimensional de los antígenos de clase II, concretamente de HLA-DR1. Descubrieron que ésta era muy similar a la de clase I, descrita unos años antes, y eran casi superponibles. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de HLA-DR1 se asemejaban al dominio  $\alpha 1$  y  $\beta 2$ -m de las moléculas de clase I y los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$



de HLA-DR1 eran superponibles respectivamente a los dominios  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Los cristales obtenidos de la molécula HLA-DR1 también evidenciaron la tendencia que presentan a formar dímeros  $(\alpha\beta)_2$ , lo que parece tener importancia en la cascada fisiológica de transducción de señales al interior celular. El punto de interacción con CD4 se ubica en el dominio  $\beta 2$  de la molécula de clase II (Köning y col. 1992; Cammarota y col. 1992).

Los dominios distales de la proteína,  $\alpha 1/\beta 1$ , forman la valva de unión del péptido que consiste en una lámina  $\beta$  formada ocho hebras antiparalelas y flanqueada por dos regiones en  $\alpha$ -hélice. La región helicoidal del dominio  $\alpha 1$  presenta un extremo amino-terminal en cadena extendida y su extremo carboxi-terminal se pliega hacia la base de la valva. Esta peculiaridad hace que la zona de unión a péptido muestre los extremos abiertos. En esta valva abierta por los extremos se puede acomodar un péptido grande, de entre 12 y 24 aas. Este péptido puede permanecer en la valva en conformación extendida y sus extremos amino y carboxi-terminales sobresalen fuera de la molécula (Rudensky y col. 1991; Chiczy y col. 1992; Rudensky y col. 1992; Stern y col. 1994; Rammensee 1995).

## 6.2. Región de genes HLA de clase II

Los genes de clase II se localizan en la región más centromérica del Sistema HLA denominada región D. Como ya se había comentado, se divide a su vez en tres subregiones, de centrómero a telómero: -DP, -DQ y -DR (Figura 11). Los genes de clase II se definen con la letra D, seguida de la inicial de la subregión (P, Q o R) y de la letra A para los genes que

codifican cadenas  $\alpha$ , o B para los genes que codifican cadenas  $\beta$ . Además, se le añade un número para designar cuantos genes A o B están presentes en cada subregión. En esta misma región se localizan otra serie de genes de clase II: HLA-DNA, HLA-DOB y HLA-DM (-A y -B), además de los genes TAP y LMP implicados en el procesamiento antigénico de las moléculas de clase I.

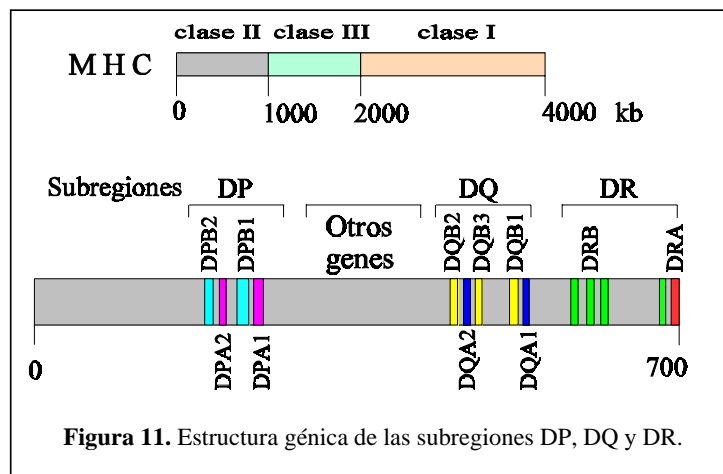


Figura 11. Estructura genética de las subregiones DP, DQ y DR.

### 6.2.1. Subregión -DP:

Ocupa unas 100 Kb y contiene dos genes A (DPA1 y DPA2) y dos B (DPB1 y DPB2). Los genes

DPA1 y DPB1, que se orientan cabeza con cabeza con sus promotores separados por 2 Kb, codifican para un heterodímero típico de clase II. DPA2 y DPB2, a pesar de presentar una secuencia génica intacta, no se expresan, por lo que se consideran pseudogenes. Las causas de esta no expresión son desconocidas; para DPA2 se postula que la inserción de una secuencia repetitiva en el intrón 1 provoca el reemplazamiento de la mayor parte del exón 1, dando lugar a un péptido líder no funcional (*Radley y col. 1994*).

### 6.2.2. Subregión -DQ:

Contiene dos genes A (DQA1 y DQA2) y tres B (DQB1, DQB2 y DQB3). DQA1 y DQB1 codifican para las proteínas HLA-DQ y los demás son pseudogenes. Los dos genes codificantes se orientan del mismo modo que los genes DP. HLA-DQA1 presenta la estructura típica de los genes A de clase II. Sin embargo, DQB1 tiene un dominio citoplasmático más corto al eliminarse por maduración, o "splicing", de su mRNA el exón 5 (*Radley y col. 1994*).

### 6.2.3. Subregión DR:

Su estructura ha sido estudiada en diferentes grupos de tal manera que el número de genes presentes en cada uno de ellos define haplotipos (genes o alelos que se heredan conjuntamente).

Dependiendo del haplotipo, aparecen un gen DRA que codifica para las cadenas  $\alpha$  y uno o dos genes DRB que lo hacen para las cadenas  $\beta$  (Figura 12). El resto de genes DRB de cada haplotipo son pseudogenes:

- *Haplotipos con un gen DRB funcional.* Presentan sólo el gen DRB1, altamente polimórfico, y el gen DRA. A éste grupo pertenecen los antígenos HLA-DR1, -DR8 y -DR10.

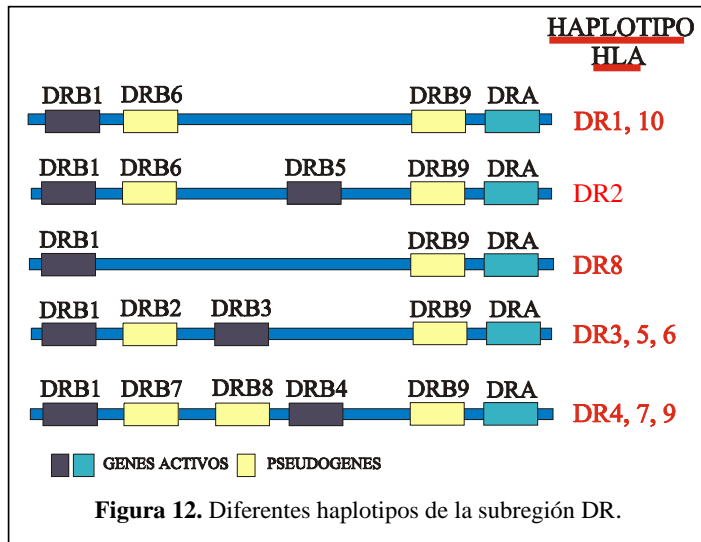
- *Haplotipos con dos genes DRB funcionales.* Poseen el gen DRB1 y otro, menos polimórfico, DRB3, DRB4 o DRB5, en función del subtipo codificado DRB1 (DR1, DR2, DR3, etc).

### 6.2.4. Otros genes de clase II

Entre las subregiones DP y DQ hay toda una serie de genes cuya estructura y función empieza a conocerse en la actualidad (Figura 13). Entre ellos están:

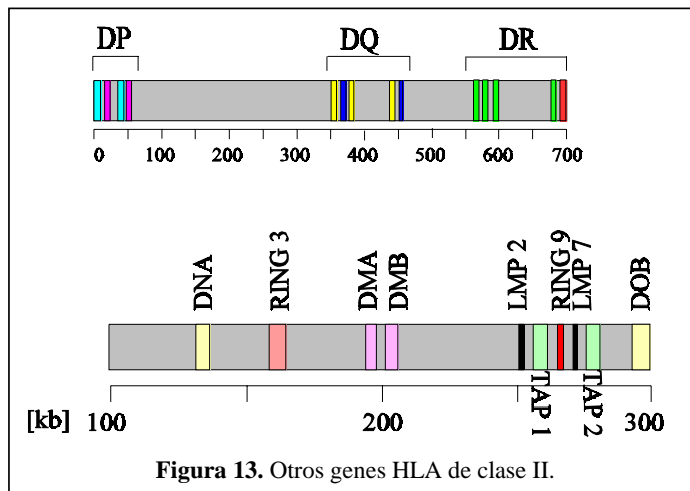
#### \* Genes DNA y DOB:

El gen DNA (*Trowsdale y Kelly 1985*) se sitúa próximo a la subregión DP y el gen DOB (*Tonnelle y col. 1985*) lo hace cerca de DQ, separados entre sí por unas 100 Kb. A pesar de esta distancia, se cree que forman heterodímeros  $\alpha/\beta$  (*Karlsson y col. 1991*). Aunque su función es todavía poco conocida, se ha postulado que al menos HLA-DOB podría ser un regulador de la carga de péptidos de los antígenos de clase II mediada por HLA-DM (*Liljedahl y col. 1996*), y recientemente se ha demostrado que ejerce una modulación negativa (*Van Ham y col. 1997*).



**\* Genes DMA y DMB:**

Se localizan entre los genes DNA y DOB (*Kelly y col. 1991a*). Están separados entre sí por unas 7.5 Kb. A diferencia de otros genes de clase II, poseen un polimorfismo restringido y la comparación de su secuencia con la de los genes de clase I y II los sitúa en una posición intermedia, son equidistantes entre ambos.



Codifican para un heterodímero  $\alpha/\beta$  integral de membrana de 261-263 aas, no detectado en la superficie celular. La estructura proteica de este dímero sería ligeramente diferente a la del resto de los antígenos de clase II ya que, si bien los dominios proximales a la membrana pertenecen a la superfamilia



de las inmunoglobulinas, los dos dominios más externos contienen aas que pueden formar múltiples puentes disulfuro que darían lugar a una conformación muy rígida y probablemente cerrada. Estos genes poseen una función relacionada con la presentación antigénica mediante moléculas HLA de clase II (ver apartado 7.2).

**\*Genes TAP1 y TAP2:**

(del inglés, **T**ransporter associated with **A**ntigen **P**rocessing).

Pertenecen a la familia de los ABC-transportadores y son proteínas que median la translocación, dependiente de la hidrólisis de ATP, a través de membranas de células eucariotas y procariotas de una gran variedad de moléculas tanto orgánicas como inorgánicas. Fueron descritos por primera vez en 1990 (*Trowsdale y col. 1990; Spies y col. 1990*).

Se han detectado en la membrana del retículo endoplasmático donde forman heterodímeros TAP1/TAP2 unidos no covalentemente. Se ha postulado que este heterodímero estaría formado por 8 a 10 dominios hidrofóbicos embebidos en la membrana del retículo y con los dominios ATP-dependientes orientados hacia el lumen (*Koopmann y col. 1997*).

Su implicación en el procesamiento antigénico mediado por las moléculas de clase I será discutida posteriormente (ver apartado 7.2).

**\*Genes LMP2 y LMP7:**

(del inglés, **L**ow **M**olecular weight **P**rotein).

Codifican para proteínas de baja masa molecular implicadas en el procesamiento antigénico. Estos dos genes, LMP2 (*Glynn y col. 1991*) y LMP7 (*Kelly y col. 1991b*), presentan alta homología con dos componentes de un complejo proteásico intracelular denominado proteasoma.

LMP2 y LMP7 están próximos y estrechamente ligados a los genes TAP. La relación entre ellos hizo postular la existencia de una regulación conjunta de su expresión. Estos hechos se han demostrado como verdaderos en el caso de TAP1 y LMP2 (*Wright y col. 1995*); ambos comparten el mismo promotor de transcripción y además presentan elementos reguladores que coordinan su expresión ante diferentes estímulos. Así, la "caja" SP1-GC promueve su actividad basal, y el elemento de respuesta a NF- $\kappa$ B coordina la respuesta inducida por TNF- $\alpha$  (**F**actor de **N**ecrosis **T**umoral: citocina implicada en el aumento de los niveles de expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune, los de clase I entre ellos). La existencia de elementos reguladores comunes entre los genes HLA de clase I, genes TAP y LMP apunta a un mecanismo regulador compartido del aumento de expresión de genes de clase I con los implicados en su transporte. En este contexto, se ha comprobado que al igual que TAP y las proteínas de clase I, la expresión de LMP2 y LMP7 es inducible por la citocina antiviral Interferón- $\gamma$  (*Singer y Maguire 1990; Belich y col. 1994; Früh y col. 1994; Groettrup y col. 1996*).



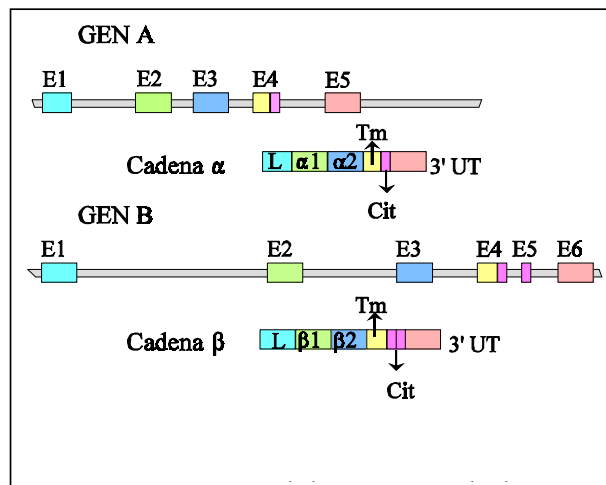
### 6.3. Estructura génica de los antígenos HLA de clase II

La correspondencia entre los exones de los genes de clase II y los dominios estructurales de la proteína madura a la que dan lugar es casi perfecta. En la figura 14 se esquematizan los genes A y B que codifican respectivamente para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los antígenos de clase II.

Las cadenas  $\alpha$  se sintetizan a partir de genes A de 5 exones que incluyen la región 5'UT, el exón 1 que codifica para el péptido líder, los exones 2 y 3 lo hacen para los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  respectivamente, el exón 4 da lugar al péptido conector, la región transmembrana y el dominio citoplasmático. La región 3'UT es codificada en parte por el exón 4 y el resto por el exón 5.

Los genes que dan lugar a las cadenas  $\beta$  están constituidos por 6 exones. El péptido líder está codificado por un exón, dos exones para los dominios de proteína  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , un cuarto exón para el péptido conector, el dominio transmembrana y parte del dominio citoplasmático, y el resto de este dominio está originado por al menos dos exones más, si bien esto último varía en las diferentes subregiones.

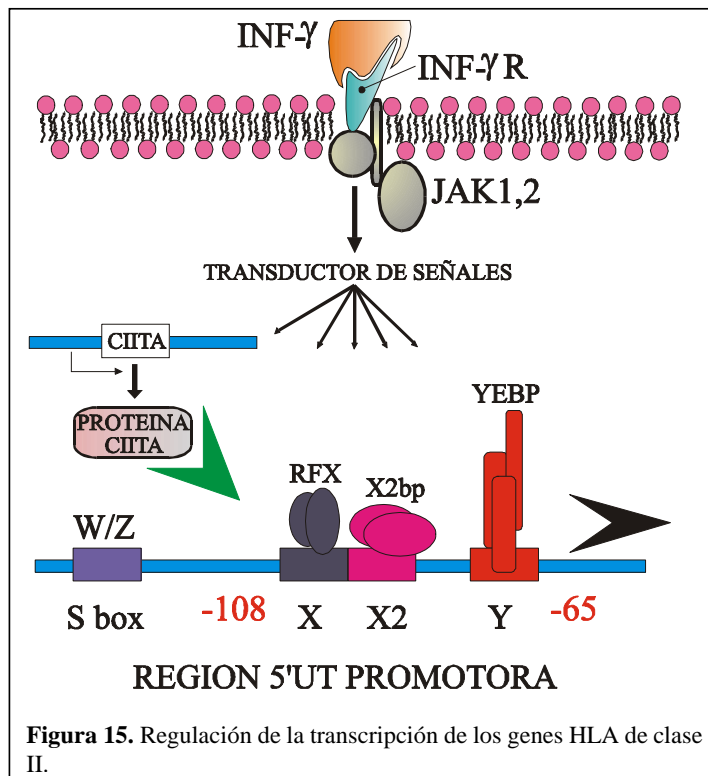
El tamaño de los intrones es muy variable. El más grande, que mide varias Kb, es el intrón 1 que separa los exones 1 y 2 de los genes A. En los genes B, también es muy grande el intrón 2, entre los exones 2 y 3. El intrón más pequeño encontrado en los genes de clase II es el intrón 3 del gen DNA, con un tamaño de 180 pares de bases (pb).



### 6.4. Regiones reguladoras de los genes de clase II

La secuenciación y análisis de mutaciones del DNA de la región 5' flanqueante de los genes de clase II ha permitido identificar toda una serie de motivos altamente conservados responsables de la regulación de estos genes. Se han descrito al menos cuatro regiones que controlan su expresión de manera constitutiva y son los denominados Elementos Reguladores en cis o "cis-acting elements": las cajas (o box) W/Z/S; las cajas X1, X2 e Y (Figura 15), que son responsables de la mayoría de los aspectos reguladores que conciernen a los genes de clase II.

- **caja Y.** Se localiza entre 40-160 pb del lugar de inicio de la transcripción. Contiene una secuencia CCAAT inversa. A esta caja se une el complejo proteico heterotrimérico denominado NF-Y



que es un regulador positivo (*Sinha y col. 1995; Ronchi y col. 1995*) y el factor YB-1 que parece modular el efecto inductor del Interferón- $\gamma$  (*Ting y col. 1994*).

- **región X.** Comprende dos elementos reguladores solapantes:

\* - un motivo de 14 pb denominado **caja X1** al cual se une el factor proteico RFX (*Reith y col. 1988*).

\*- **caja X2** de 7-8 pb. Muestra homología con los CRE [Elementos de **R**espuesta a AMP-Cíclico (AMPc)]. A ella se une el factor proteico X2BP (**X2 Binding Protein**) (*Hasagawa y Boss 1991*). Los factores RFX y X2BP cooperan y se unen estrechamente a las cajas X y ambos confieren estabilidad al complejo DNA-proteína formado (*Moreno y col. 1995*).

- **región de cajas W.** Se localiza en las 30-40 pb anteriores a la caja X. Contiene los subelementos Z y S. Parece ser que esta caja induce la transcripción mediada por INF- $\gamma$  (*Vilen y col. 1992*). Posteriormente se ha descrito que el subelemento S une el factor RFX (*Jabrane-Ferrat y col. 1996*).

Además de estos motivos que parecen estar presentes en todos los promotores de los genes de clase II, existen otros de distribución más variable presentes solamente en algunos genes:

- La "TATA box" presente en el gen DRA (*Matsushima y col. 1992*).

- "V box", elemento silenciador encontrado en el gen DRA.
- "Elemento J". Podría ser un elemento de respuesta a INF- $\gamma$  en los genes DRB1, DPA1 y DQB1 (Louis y col. 1993).

El descubrimiento de un nuevo factor regulador de la transcripción denominado CIITA (del inglés, MHC Class II TransActivator), ha abierto una nueva vía en la comprensión del mecanismo de regulación de estos genes (Chang y col. 1994). Este factor no se uniría al DNA sino que podría funcionar como coactivador imprescindible para la regulación general de la expresión de las moléculas de clase II. También regularía la expresión de los genes DM y de la Cadena Invariante implicados en el procesamiento antigénico (Chang y Flavell 1995). Recientemente, se ha comprobado que también interviene en el control de la transcripción de los genes de clase I (Gobin y col. 1998). A diferencia de los factores RFX, X2BP y NF-Y que aparecen de manera ubicua en todos los tejidos, la proteína CIITA solamente se ha encontrado en células que expresan genes de clase II sugiriendo que sería el factor limitante en la regulación de estos genes (Chang y col. 1994; Steimley y col. 1994). La regulación de la expresión de las proteínas codificadas por los genes de clase II también se efectúa a nivel post-transcripcional. Se han descrito al menos dos proteínas que interaccionan con las regiones 3'UT no traducidas del mRNA de HLA-DRA (Pozzo y col. 1994). Esta interacción parece condicionar la cantidad de mensajero que se traduce a proteína.

## 7. FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA

### 7.1. Presentación antigénica de las moléculas HLA de clase I

Las moléculas de clase I actúan como receptores de péptidos endógenos, propios normales y alterados (tumoraes), y virales, para hacerlos accesibles a la detección por las células T que llevan en su superficie celular el marcador CD8+ (mayoritariamente linfocitos citotóxicos), aunque las células presentadoras de antígeno también pueden presentar péptidos procedentes de proteínas exógenas para ser reconocidas por el mismo tipo de linfocitos T (Kovacsóvics-Bankowski y Rock 1995; Norbury y col. 1995).

Las funciones de unión de péptidos y presentación implican que cada molécula de clase I puede formar complejos con un amplio espectro de péptidos, sin embargo cada una de ellas une un grupo determinado, lo cual indica que estas moléculas presentan selectividad alelo-específica (Falk y col. 1991). La estructura cristalina de la molécula HLA con el péptido unido ha revelado cómo un único producto alélico puede unir un extenso panel de péptidos con alta afinidad (Madden y col. 1995).

El tamaño adecuado de estos péptidos es de 8 a 11 aas (Falk y col. 1991; Latron y col. 1992; Rammensee y col. 1993) y sus extremos carboxilo y amino terminales están fuertemente fijados al borde

de la hendidura (Madden y col. 1995), a diferencia de los péptidos para clase II en los que son los aas centrales los que interaccionan con la valva. Prácticamente, el único requerimiento imprescindible para que el péptido se adapte bien a la valva es que el aminoácido carboxi terminal sea hidrofóbico o cargado (Rammensee y col. 1993), permitiéndose casi cualquier aminoácido excepto prolina y probablemente glicina (Momburg 1994). Las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos P1, P2, P3, P6, P7 y P9 interactúan con los bolsillos A, B, D, C, E y F respectivamente (ver Figura 6) (Madden y col. 1992; Falk y col. 1991). Para péptidos más largos de 9 aas, los extremos se adaptan a los bolsillos A y F, y los demás se curvan hacia fuera de la valva. Las interacciones entre los bolsillos y los aas ancla están mediadas por puentes de hidrógeno (Matsumura y col. 1992).

La arquitectura de la valva permite que sus residuos interaccionen con el péptido y puedan adoptar conformaciones opcionales para mejorar esta unión (Matsumura y col. 1992). Además, la mayor parte de estas interacciones confieren estabilidad a la molécula y al péptido, y los hacen más accesibles al contacto con el TcR de la célula T (Zhang y col. 1992).

Como ya se ha comentado, la inmensa mayoría de los péptidos presentados por las moléculas de clase I son generados a partir de proteínas localizadas en el interior celular, las cuales son degradadas en un orgánulo especial formado por un complejo proteásico ATP dependiente llamado PROTEASOMA (Goldberg y Rock 1992; Koopmann y col. 1997).

El único requerimiento específico para que una proteína entre en el proteasoma de forma eficaz es que posea una cola de ubiquitina unida de forma covalente (Ciechanover 1994; Groettrup y col. 1996).

La implicación de este complejo proteásico específico en la presentación antigénica fue sugerido tras el hallazgo de dos subunidades, LMP2 y LMP7, cuyos genes mapean en el MHC (Glynne y col. 1991). Se ha demostrado que ambos, tras ser inducidos por INF- $\gamma$ , reemplazan a dos subunidades constitutivas del proteasoma (Früh y col. 1994; Belich y col. 1994), de manera que orientan el procesamiento hacia un patrón distinto, y probablemente específico, de los requerimientos de las moléculas HLA de clase I (Gaczynska y col. 1994).

El descubrimiento de otro activador inducible por INF- $\gamma$  (Realini y col. 1994) y que también modifica la especificidad del proteasoma, el 11S-regulador o PA28 (subunidad que forma parte del proteasoma), ha sugerido la posibilidad de que estos tres componentes -LMP2, LMP7 y PA28- sean los responsables de los cambios específicos que sufre el proteasoma (Groettrup y col. 1995; Lehner y Cresswell 1996).

Los péptidos generados en el citosol han de ser translocados a través de la membrana del retículo endoplasmático por los transportadores de péptidos TAP1 y TAP2, translocación dependiente de ATP. No está claro si los péptidos, una vez en el lumen del retículo, sufren un procesamiento proteolítico añadido (Koopmann y col. 1997). La molécula HLA de clase I madura consta de tres componentes: las dos cadenas polipeptídicas (cadena pesada  $\alpha$  y la  $\beta$ 2-m) y el péptido. Al igual que todas las proteínas, en la mayoría de los orgánulos, sufre plegamientos y ensamblajes facilitados, y en parte controlados, por las

denominadas chaperonas. Las chaperonas se caracterizan por la falta de especificidad de sustrato, el bajo número de recambio (turnover) y por no catalizar reacciones de plegamiento específicas. Básicamente parecen unir y estabilizar la conformación "no nativa" de las proteínas impidiendo su agregación (*Melnick y Argon 1995*). Entre ellas los miembros de las familias de las "heat shock proteins", hsp60 y hsp70, que pertenecen a las llamadas "proteínas inducibles por estrés" (stress-induced proteins). El modelo de ensamblaje propuesto para las moléculas HLA de clase I (*Koopmann y col. 1997*) implica toda una serie de interacciones sucesivas (Figura 16):

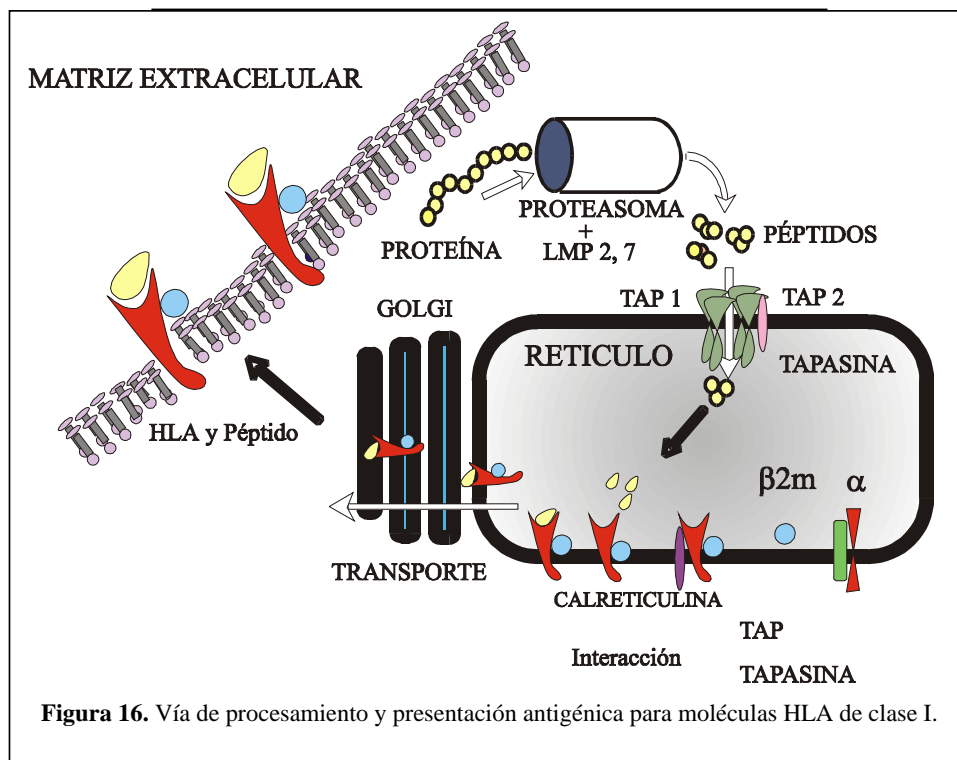
1. La cadena pesada nascente se asocia principalmente a la proteína BiP (**B**inding **P**rotein) o a la calnexina (*Vassilakos y col. 1996*).
2. La unión de la  $\beta$ 2-m promueve la liberación de la calnexina, probablemente por un cambio conformacional de la cadena  $\alpha$  (*Nossner y Parham 1995*).
3. Más tarde se forma un nuevo complejo constituido por la cadena  $\alpha/\beta$ 2-m al que se unen dos nuevas chaperonas, la calreticulina y la tapasina, y posteriormente el heterodímero TAP1/TAP2 (*Sadasivan y col. 1996*).
4. Una vez formado este complejo, la molécula de clase I es cargada con el péptido proporcionado por TAP1/TAP2, adquiere la conformación madura, se libera y es transportado hacia la membrana celular a través del cis- y trans-Golgi siguiendo la ruta secretora (*Carreno y col. 1995*).

## 7.2. Presentación antigénica de las moléculas HLA de clase II

Las moléculas de clase II unen un grupo heterogéneo de péptidos procedentes en su mayor parte del exterior celular y se encargan de "exponerlos" en la superficie de las células presentadoras de antígenos (linfocitos B, células dendríticas y macrófagos) para ser "inspeccionados" por el TcR de los linfocitos T CD4+ (generalmente cooperadores). La mayor parte de los péptidos presentados por las moléculas de clase II provienen de la degradación endocítica de proteínas exógenas o bien, en menor medida, de proteínas endógenas que acceden a los endosomas (Figura 17).

El ensamblaje de la molécula de clase II con el péptido ocurre en unos compartimentos ácidos especiales llamados MIIC (del inglés, **MHC Class II Compartment**) (Tulp y col. 1994; Pieters 1997).

La estructura física del antígeno de clase II, así como la ruta proteolítica seguida por las proteínas cuyos péptidos van a ser presentados, hacen que el tamaño final de éstos varíe de 12 a 25 aas (Stern y col.



1994; Rammensee y col. 1995).

Mientras los péptidos se están formando, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los antígenos HLA de clase II son sintetizadas en el retículo endoplasmático e inmediatamente el heterodímero naciente se asocia a la



cadena invariante, Ii (proteína de membrana de tipo II invertida). La cadena invariante, además de ayudar al ensamblaje de las cadenas  $\alpha/\beta$  también bloquea la hendidura del heterodímero impidiendo la unión de péptidos en el retículo endoplásmico. La unión está mediada por la proteína BiP y la calnexina (Marks y col. 1995) además de otras chaperonas que ayudan a la estabilización y ensamblaje correcto de complejos nonaméricos  $(\alpha/\beta)3Ii3$  (Roche y col. 1991; Cresswell 1994). Estos complejos son rápidamente exportados hacia los compartimentos endocíticos a través del aparato de Golgi guiados por las señales de la cola citoplasmática de la cadena invariante (Pieters y col. 1993). Cuando el complejo nonamérico entra en el endosoma la cadena invariante sufre una proteólisis secuencial, mediada por proteasas, catepsinas entre ellas, que la reducirá a un pequeño péptido de unos 20 aas denominado CLIP (del inglés, **C**lass **I**I **A**ssociated **I**i **P**eptide) y que ocupará la hendidura (Ghosh y col. 1995). En este proceso es cuando los complejos nonaméricos se disocian en dímeros  $\alpha/\beta$  y es cuando entra en juego otro heterodímero, DMA/DMB, que actúa como catalizador que promueve la separación del CLIP y la unión del péptido antigénico, reacción favorecida por el pH ácido del compartimento MIIC (Denzin y Cresswell 1995; Sloan y col. 1995). Sin embargo, el mecanismo exacto de este intercambio, así como el sustrato sobre el que actúa la molécula HLA-DM permanecen todavía poco claros.

### 7.3. Selección del repertorio de linfocitos T

La presentación de péptidos en el contexto de las moléculas HLA de clase I y II es esencial durante la selección del repertorio útil de los linfocitos T en el timo. Cada timocito genera por reordenamiento un TcR $\alpha\beta$  (o  $\gamma\delta$ ) único y probablemente irrepetible. Inicialmente, se produce una selección positiva rescatando aquellos timocitos con reordenamientos funcionales de los TcR, que son capaces de reconocer a las moléculas HLA con un péptido. Posteriormente, puesto que la especificidad de cada TcR ya no cambiará mediante maduración de su afinidad, se desarrolla una selección negativa para eliminar aquellos timocitos que pudieran convertirse en linfocitos autorreactivos, y lo hace según la afinidad de estos TcRs por las moléculas HLA de clase I y II con péptidos propios unidos. Los timocitos cuyo TcR posean una afinidad muy elevada o muy baja serán seleccionados negativamente (apoptosis), quedando aquellos timocitos con afinidad media-baja por los péptidos propios.

## 8. CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA HLA

### 8.1. Polimorfismo del sistema HLA

El sistema HLA presenta un enorme polimorfismo en los genes cuyas proteínas participan en la presentación antigénica: genes HLA de clase I clásicos (A, B y C) y de clase II (DR, DQ y DP). Esta característica implica que dos individuos, sin ser parientes, tengan muy pocas probabilidades de ser HLA

idénticos.

### 8.1.1. Polimorfismo serológico

El polimorfismo del sistema HLA se detectó inicialmente mediante técnicas serológicas (*Terasaki y McClelland 1964; Mittal y col. 1968; Danilovs y col. 1980*), que consisten en ensayos de linfocitotoxicidad por anticuerpos mediada por complemento. Por tanto, es necesario disponer de anticuerpos monoclonales o policlonales (menos frecuentes actualmente) para reconocer un antígeno HLA en diferentes laboratorios. Las nuevas especificidades son revisadas cada cuatro años de forma oficial en los Talleres Internacionales de Histocompatibilidad por el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el último Taller Internacional de Histocompatibilidad (Paris, 1996) se reconocieron oficialmente 28 especificidades de la serie A, 61 para la serie B, 10 de la serie C, 24 de la serie DR, 9 de la serie DQ y 6 para HLA-DP (*Bodmer y col. 1997a*) (Tabla 1).

### 8.1.2. Polimorfismo genético

Este se ha incrementado de forma exponencial respecto al detectado por técnicas serológicas. El descubrimiento y aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction, *Saiki y col. 1985*), ha permitido desarrollar nuevas técnicas moleculares de caracterización del polimorfismo genético de los alelos HLA de clase I y clase II: amplificación e hibridación con oligosondas específicas de alelo o grupos de alelos (oligotipaje directo y reverso), y la secuenciación de DNA genómico y cDNA. En el último Taller Internacional de Histocompatibilidad (Paris, 1996) se reconocieron oficialmente 98 alelos para el locus A, 212 para el locus B, 195 para el locus DRB1, 19 para el locus DQA1, 35 para el locus DQB1, 10 para el locus DPA1 y 77 para el locus DPB1 (ver Tablas 2 y 3) (*Bodmer y col. 1997a*). Hasta Julio de 2001 se han reconocido oficialmente los siguientes alelos (<http://www.anthonynolan.com/HIG>):

HLA de clase I		HLA de clase II	
Loci	Nº de alelos	Loci	Nº de alelos
A	225	DRA	2
B	444	DRB	358
C	111	DQA1	22
E	6	DQB1	47
F	1	DPA1	20
G	15	DPB1	96
		DMA	4
		DMB	6

Debido a la gran cantidad de polimorfismos diferentes encontrados, el Comité de Nomenclatura revisa y publica mensualmente los nuevos alelos, así como los alelos que confirman los ya existentes.

Los genes de clase I clásicos presentan la variabilidad genética fundamentalmente en los exones 2 y 3, que codifican respectivamente para los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la molécula. Por su parte, los genes B de clase II (DPB, DQB y DRB) localizan la variabilidad genética principalmente en el exón 2 y de manera similar ocurre para los genes A de clase II (DPA1, DQA1, DRA).

**Tabla 1.** Nomenclatura de las variantes polimórficas determinadas por técnicas serológicas de los antígenos HLA de clase I y II (*Bodmer y col. 1997a*).

HLA-A		HLA-B			HLA-C
A1	A28	B5	B40	B59	Cw1
A2	A29(19)	B7	B4005	B60(40)	Cw2
A0203	A30(19)	B703	B41	B61(40)	Cw3
A210	A31(19)	B8	B42	B62(15)	Cw4
A3	A32(19)	B12	B44(12)	B63(15)	Cw5
A9	A33(19)	B13	B45(12)	B64(14)	Cw6
A10	A34(10)	B14	B46	B65(14)	Cw7
A11	A36	B15	B47	B67	Cw8
A19	A43	B16	B48	B70	Cw9(w3)
A23(9)	A66(10)	B17	B49(21)	B71(70)	Cw10(w3)
A24(9)	A68(28)	B18	B50(21)	B72(70)	
A2403	A69(28)	B21	B51(5)	B73	
A25(10)	A74(19)	B22	B5102	B75(15)	
A26(10)	A80	B27	B5103	B76(15)	
		B2708	B52(5)	B77(15)	
		B35	B53	B78	
		B37	B54(22)	B81	
		B38(16)	B55(22)		
		B39	B56(22)	Bw4	
		B3901	B57(17)	Bw6	
		B3902	B58(17)		

HLA-DR		HLA-DQ	HLA-DP	HLA-D	
DR1	DR13(6)	DQ1	DPw1	Dw1	Dw14
DR103	DR14(6)	DQ2	DPw2	Dw2	Dw15
DR2	DR1403	DQ3	DPw3	Dw3	Dw16
DR3	DR1404	DQ4	DPw4	Dw4	Dw17(w7)
DR4	DR15(2)	DQ5(1)	DPw5	Dw5	Dw18(w6)
DR5	DR16(2)	DQ6(1)	DPw6	Dw6	Dw19(w6)
DR6	DR17(3)	DQ7(3)		Dw7	Dw20
DR7	DR18(3)	DQ8(3)		Dw8	Dw21
DR8		DQ9(3)		Dw9	Dw22

DR9	DR51	Dw10	Dw23
DR10	DR52	Dw11(w7)	Dw24
DR11(5)	DR53	Dw12	Dw25
DR12(5)		Dw13	Dw26

---

Los antígenos que llevan a continuación otro número entre paréntesis son un subtipo del antígeno entre paréntesis.

**Tabla 2.** Nomenclatura de las variantes alélicas determinadas por técnicas de secuenciación del exón 2 y 3 del gen que codifica la cadena  $\alpha$  de los antígenos HLA de clase I (*Bodmer y col. 1997a*).

HLA-A		HLA-B				HLA-C	
A*0101	A*2414	B*07021	B*1529	B*3519	B*4406	B*67011	Cw*0102
A*0102	A*2501	B*07022	B*1530	B*3520	B*4407	B*67012	Cw*0103
A*0103	A*2502	B*07023	B*1531	B*3701	B*4408	B*7301	Cw*02021
A*0104N	A*2601	B*0703	B*1532	B*3702	B*4409	B*7801	Cw*02022
A*02011	A*2602	B*0704	B*1533	B*3801	B*4410	B*78021	Cw*02023
A*0202	A*2603	B*0705	B*1534	B*38021	B*4501	B*78022	Cw*02024
A*0203	A*2604	B*0706	B*1535	B*38022	B*4601	B*8101	Cw*0302
A*0204	A*2605	B*0707	B*1536	B*39011	B*4701	B*8102	Cw*03031
A*0205	A*2606	B*0708	B*1537	B*39013	B*4702		Cw*03041
A*0206	A*2607	B*0801	B*1538	B*39021	B*4703		Cw*03042
A*0207	A*2608	B*0802	B*1539	B*39022	B*4801		Cw*04011
A*0208	A*2609	B*0803	B*1540	B*3903	B*4802		Cw*04012
A*0209	A*2610	B*0804	B*1541	B*3904	B*4803		Cw*0402
A*0210	A*2611N	B*0805	B*1801	B*3905	B*4901		Cw*0403
A*0211	A*2901	B*1301	B*1802	B*39061	B*5001		Cw*0404
A*0212	A*2902	B*1302	B*1803	B*39062	B*5002		Cw*0501
A*0213	A*2903	B*1303	B*1804	B*3907	B*51011		Cw*0602
A*0214	A*3001	B*1304	B*1805	B*3908	B*51012		Cw*0701
A*0215N	A*3002	B*1401	B*2701	B*3909	B*51021		Cw*0702
A*0216	A*3003	B*1402	B*2701	B*3910	B*51022		Cw*0703
A*02171	A*3004	B*1403	B*2702	B*3911	B*5103		Cw*0704
A*02172	A*3006	B*1404	B*2703	B*3912	B*5104		Cw*0705
A*0218	A*31012	B*1405	B*2704	B*40011	B*5105		Cw*0706
A*0219	A*3201	B*1501	B*27052	B*40012	B*5106		Cw*0707
A*0220	A*3202	B*1502	B*27053	B*4002	B*5107		Cw*0708
A*0221	A*3301	B*1503	B*2706	B*4003	B*5108		Cw*0801
A*0222	A*3303	B*1504	B*2707	B*4004	B*5109		Cw*0802
A*0224	A*3401	B*1505	B*2708	B*4005	B*5110		Cw*0803
A*0225	A*3402	B*1506	B*2709	B*4006	B*5111N		Cw*0804
A*0226	A*3601	B*1507	B*2710	B*4007	B*52011		Cw*12021
A*0301	A*4301	B*1508	B*2711	B*4008	B*52012		Cw*12022
A*0302	A*6601	B*1509	B*2712	B*4009	B*5301		Cw*1203
A*0303N	A*6602	B*1510	B*3501	B*4010	B*5302		Cw*12041
A*0304	A*6603	B*1511	B*3502	B*4011	B*5401		Cw*12042
A*1101	A*68011	B*1512	B*3503	B*4012	B*5501		Cw*1205
A*1102	A*68012	B*1513	B*3504	B*4013	B*5502		Cw*1301
A*1103	A*6802	B*1514	B*3505	B*4014	B*5503		Cw*14021
A*1104	A*68031	B*1515	B*3506	B*4015	B*5504		Cw*1403
A*2301	A*68032	B*1516	B*3507	B*4016	B*5505		Cw*1502
A*240210	A*6804	B*1517	B*3508	B*4017	B*5506		Cw*1503
A*240210L	A*6805	B*1518	B*35091	B*4018	B*5601		Cw*1504
A*2403	A*6806	B*1519	B*35092	B*4101	B*5602		Cw*15051
A*2404	A*6901	B*1520	B*3510	B*4102	B*5603		Cw*15052
A*2405	A*7401	B*1521	B*3511	B*4103	B*5604		Cw*1506
A*2406	A*7402	B*1522	B*3512	B*4201	B*5701		Cw*1601
A*2407	A*7403	B*1523	B*3513	B*4202	B*5702		Cw*1602
A*2408	A*8001	B*1524	B*3514	B*4402	B*5703		Cw*16041
A*2409		B*1525	B*3515	B*44031	B*5704		Cw*1701
A*2410		B*1526N	B*3516	B*44032	B*5801		Cw*1702
A*2411N		B*1527	B*3517	B*4404	B*5802		Cw*1801
A*2413		B*1528	B*3518	B*4405	B*5901		Cw*1802

**Tabla 3.** Nomenclatura de las variantes alélicas determinadas por técnicas de secuenciación del exón 2 de los genes que codifican para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los antígenos HLA de clase II (*Bodmer y col. 1997a*).

HLA-DRA	HLA-DRB1					
DRA*0101	DRB1*0101	DRB1*0414	DRB1*0815	DRB1*1125	DRB1*1320	DRB1*1420
DRA*0102	DRB1*01021	DRB1*0415	DRB1*0816	DRB1*1126	DRB1*1321	DRB1*1421
	DRB1*01022	DRB1*0416	DRB1*0817	DRB1*1127	DRB1*1322	DRB1*1422
	DRB1*0103	DRB1*0417	DRB1*0818	DRB1*1128	DRB1*1323	DRB1*1423
	DRB1*0104	DRB1*0418	DRB1*0819	DRB1*1129	DRB1*1324	DRB1*1424
	DRB1*03011	DRB1*0419	DRB1*09012	DRB1*1130	DRB1*1325	DRB1*1425
	DRB1*03012	DRB1*0420	DRB1*1001	DRB1*1131	DRB1*1326	DRB1*1426
	DRB1*03021	DRB1*0421	DRB1*11011	DRB1*1201	DRB1*1327	DRB1*1427
	DRB1*03022	DRB1*0422	DRB1*11012	DRB1*12021	DRB1*1328	DRB1*1428
	DRB1*0303	DRB1*0423	DRB1*11013	DRB1*12022	DRB1*1329	DRB1*1429
	DRB1*0304	DRB1*0424	DRB1*1102	DRB1*12032	DRB1*1330	DRB1*1430
	DRB1*0305	DRB1*0425	DRB1*1103	DRB1*1204	DRB1*1331	DRB1*1431
	DRB1*0306	DRB1*0426	DRB1*11041	DRB1*1205	DRB1*1332	DRB1*15011
	DRB1*0307	DRB1*0427	DRB1*11042	DRB1*1301	DRB1*1333	DRB1*15012
	DRB1*0308	DRB1*0701	DRB1*1105	DRB1*1302	DRB1*1401	DRB1*15021
	DRB1*0309	DRB1*0703	DRB1*1106	DRB1*13031	DRB1*1402	DRB1*15022
	DRB1*0310	DRB1*0801	DRB1*1107	DRB1*13032	DRB1*1403	DRB1*15023
	DRB1*0311	DRB1*08021	DRB1*1108	DRB1*1304	DRB1*1404	DRB1*1503
	DRB1*04011	DRB1*08022	DRB1*1109	DRB1*1305	DRB1*1405	DRB1*1504
	DRB1*04012	DRB1*08032	DRB1*1110	DRB1*1306	DRB1*1406	DRB1*1505
	DRB1*0402	DRB1*08041	DRB1*1112	DRB1*13071	DRB1*1407	DRB1*1506
	DRB1*0403	DRB1*08042	DRB1*1113	DRB1*1308	DRB1*1408	DRB1*16011
	DRB1*0404	DRB1*08043	DRB1*1114	DRB1*1309	DRB1*1409	DRB1*16012
	DRB1*04051	DRB1*0805	DRB1*1115	DRB1*1310	DRB1*1410	DRB1*16021
	DRB1*04052	DRB1*0806	DRB1*1116	DRB1*1311	DRB1*1411	DRB1*16022
	DRB1*0406	DRB1*0807	DRB1*1117	DRB1*1312	DRB1*1412	DRB1*1603
	DRB1*0407	DRB1*0808	DRB1*1118	DRB1*1313	DRB1*1413	DRB1*1604
	DRB1*0408	DRB1*0809	DRB1*1119	DRB1*1314	DRB1*1414	DRB1*1605
	DRB1*0409	DRB1*0810	DRB1*1120	DRB1*1315	DRB1*1415	DRB1*1607
	DRB1*0410	DRB1*0811	DRB1*1121	DRB1*1316	DRB1*1416	DRB1*1608
	DRB1*0411	DRB1*0812	DRB1*1122	DRB1*1317	DRB1*1417	
	DRB1*0412	DRB1*0813	DRB1*1123	DRB1*1318	DRB1*1418	
	DRB1*0413	DRB1*0814	DRB1*1124	DRB1*1319	DRB1*1419	

HLA-DQA1		HLA-DQB1			
DQA1*0101	DQA1*0303	DQB1*0501	DQB1*0603	DQB1*0611	DQB1*0302
DQA1*01021	DQA1*0401	DQB1*0502	DQB1*0604	DQB1*0612	DQB1*03032
DQA1*01022	DQA1*05011	DQB1*05031	DQB1*06051	DQB1*0613	DQB1*0304
DQA1*0103	DQA1*05012	DQB1*05032	DQB1*06052	DQB1*0614	DQB1*0305
DQA1*0104	DQA1*05013	DQB1*0504	DQB1*0606	DQB1*0201	DQB1*0306
DQA1*0105	DQA1*0502	DQB1*06011	DQB1*0607	DQB1*0202	DQB1*0307
DQA1*0201	DQA1*0503	DQB1*06012	DQB1*0608	DQB1*0203	DQB1*0401
DQA1*03011	DQA1*0504	DQB1*06013	DQB1*0609	DQB1*03011	DQB1*0402
DQA1*0302	DQA1*06011	DQB1*0602	DQB1*0610	DQB1*03012	
	DQA1*06012				

### 8.1.3. Nomenclatura

Siguiendo la nomenclatura establecida por la OMS, los alelos de clase I se definen por la letra A, B o C (en función de su loci genético HLA) seguido de una serie de números, y en ocasiones de una letra (Tabla 2). Los dos primeros números definen la especificidad serológica cuando ha sido identificado con un anticuerpo, o en su defecto, definen la familia con la que posee mayor homología de secuencia de DNA. Los dos números siguientes indican el alelo dentro de esa familia y se asigna por orden cronológico consecutivo. Existe un quinto dígito para aquellos alelos con cambios en la secuencia primaria de DNA (normalmente en la tercera base de uno o más codones) que no producen cambio en la proteína codificada (por ejemplo, B\*39061 y B\*39062). También se han identificado alelos que no se expresan (nulos o en inglés "Null") y que se nombran incluyendo la letra N como último carácter en el nombre del alelo (por ejemplo, A\*0215N).

Los alelos de clase II siguen las mismas reglas de nomenclatura genética, se definen por la letras de la subregión (DR, DQ, DP) seguidos de A o B para indicar que codifican respectivamente para la cadena  $\alpha$  o  $\beta$ . Después un número que indica la versión del gen, y por último los caracteres alfanuméricos, por ejemplo, DRA1\*0101-DRB1\*03011 (Tabla 3). A diferencia de clase I, para clase II no existe una correlación lógica entre la nomenclatura genética y la serológica, puesto que ambos genes, A (alfa) y B (beta), son polimórficos (excepto DRA). Así, el antígeno DQ5 (variante de DQ1) está codificado a nivel genético por los loci DQA1\*0102 y DQB1\*0602.

La OMS ha decidido asignar solamente nombre oficial a aquellos patrones de reacción serológicos que correlacionen con secuencias de DNA, ya que puede haber patrones de reacción cruzada entre diferentes antígenos por compartir determinados epitopos.

### 8.1.4. Implicaciones funcionales y evolutivas del polimorfismo HLA

De forma general, las fuerzas que impulsan la evolución natural pueden resumirse en dos:

- 1) Variabilidad genética: genera diferentes variantes en el material genético a través de mecanismos como:
  - a) Sustituciones: cambio de un nucleótido por otro.
  - b) Deleciones y duplicaciones: cambios en el número de genes y/o número de nucleótidos dentro de un gen.
  - c) Inversiones y translocaciones: cambios en la situación y orientación de los genes en el cromosoma.
  - d) Fusiones, fisiones, aneuploidías, haploidías y poliploidías: cambios en el número de cromosomas.
- 2) Selección natural: las variantes naturales más ventajosas se seleccionan frente a las que peor cumplen su función.

La existencia de este elevado polimorfismo en los genes de clase I (clásicos) y de clase II, se encuentra en estrecha relación con la función inmune de las proteínas que codifican. Entre los mecanismos que dirigen la variabilidad genética de los genes HLA se encuentran las recombinaciones no homólogas, conversiones génicas y deleciones. Sin embargo, estos mecanismos no son exclusivos de los genes HLA (y MHC en general). De la multitud de alelos que se generan con estos mecanismos (y quizá otros), únicamente observamos aquellos que se seleccionan y puedan mejorar, o al menos no empeorar, e incluso ampliar la respuesta inmune respecto a un repertorio de antígenos.

## 8.2. Desequilibrio de ligamiento del sistema HLA

### 8.2.1. Definición de haplotipo

El término haplotipo fue introducido por Ceppellini y colaboradores (1967) para describir “la combinación de determinantes antigénicos individuales que son controlados positivamente por un alelo”. A pesar de su definición original, actualmente nos podemos referir al término haplotipo como “una combinación de alelos de loci estrechamente ligados en un mismo cromosoma, que poseen afinidad funcional, y que se observan en mayor frecuencia de lo que cabría esperar del producto de sus frecuencias génicas”.

En un caso hipotético, el haplotipo más simple consiste en dos loci cercanos (1 y 2) con dos alelos cada uno ( $1^a$ ,  $1^b$ ,  $2^a$  y  $2^b$ ). En el doble heterocigoto  $1^a2^a/1^b2^b$ , la combinación  $1^a2^a$  es el haplotipo A y la combinación  $1^b2^b$  es el haplotipo B.

En un caso menos simple, como es el sistema HLA, un haplotipo más complejo podría estar formado por varios loci de un cromosoma denominándose haplotipo extendido, en el que incluso pueden aparecer genes muy ligados pero sin relación funcional.

### 8.2.2. Desequilibrio de ligamiento

Con el número de alelos identificados para cada uno de los loci genéticos HLA de clase I clásicos y de clase II, deberíamos observar en condiciones de equilibrio tantos haplotipos como el producto de su número de alelos. Teniendo únicamente en cuenta HLA-A ( $n=165$ ) y HLA-B ( $n=327$ ), resultarían 53.955 haplotipos HLA-A-B en condiciones de equilibrio. Obviamente, el número que se ha encontrado en las diferentes poblaciones es mucho menor, y aunque no se hayan determinado todos los haplotipos existentes, estos probablemente no alcanzan la cifra esperada.

Los estudios realizados sobre poblaciones muestran la presencia de ciertas combinaciones de alelos (haplotipos) en mayor frecuencia de lo que se esperaría del producto de sus frecuencias génicas. Los antígenos HLA-A1 y -A3, por ejemplo, tienen cada uno en una población frecuencias de 0.14, y los antígenos HLA-B7 y -B8 presentan ambos una frecuencia de 0.10. Los haplotipos teóricos resultantes A1-



B7, A1-B8, A3-B7 y A3-B8 deberían tener una frecuencia de  $0.14 \times 0.10 = 0.014$ . Sin embargo, las frecuencias son las siguientes:

Haplotipo	Frecuencia esperada	Frecuencia observada	Diferencia ( $\Delta$ o D)
A1-B7	0.014	0.007	-0.007
A1-B8	0.014	0.048	+0.034
A3-B7	0.014	0.067	+0.053
A3-B8	0.014	0.002	-0.012

Este fenómeno se denomina **desequilibrio de ligamiento** ( $\Delta$  o D) y representa la diferencia entre las frecuencias haplotípicas observadas y esperadas.

Los haplotipos se pueden obtener de estudios en familias (*Hiller y col. 1978*) o ser calculadas del estudio de población no relacionada, siempre que el número sea representativo con el fin de cometer el menor error posible.

### 8.2.3. Parámetros que miden el desequilibrio de ligamiento

- $\Delta$  o D, calculado a partir del test de  $\chi^2$  mediante tablas de contingencia 2x2.
- D', desequilibrio de ligamiento normalizado que ajusta la influencia de las frecuencias alélicas variables.  $D' = D/D_{max}$ , y  $D_{max}$  = máximo D dadas las frecuencias alélicas. Fluctúa entre  $-1$  y  $+1$ . Es útil en la comparación de diferentes valores de D.
- DPA (del inglés, Disequilibrium Pattern Analysis); este proporciona el patrón de todos los haplotipos bi-locus que comparten un alelo determinado.

### 8.2.4. Origen del desequilibrio de ligamiento

Se desconoce la razón de la existencia de haplotipos y su desequilibrio de ligamiento, pero se podría explicar por dos causas distintas:

- 1) La presión selectiva, ya que se ha sugerido que ciertas combinaciones de alelos HLA de diferentes loci podrían ser necesarias para el desarrollo de una respuesta inmune correcta a patógenos concretos encontrados en una área geográfica determinada, especialmente en épocas con frecuentes epidemias.
- 2) El efecto fundador por el que determinada población procedente de un lugar específico se establece en otro, modificando la base genética de la población existente en este último.

## 9. APLICACIONES AL ESTUDIO DEL SISTEMA HLA

El descubrimiento de las moléculas HLA actuando como antígenos en una situación artificial de trasplante de tejidos, y el polimorfismo tan elevado que presentan este sistema genético ha permitido su estudio aplicado a las siguientes disciplinas:

- **Clínicas:** la compatibilidad HLA es favorable en los trasplantes de riñón, donde la aceptación del órgano es función de la compatibilidad entre los antígenos HLA-B y -DR, según se deduce de estudios retrospectivos. La compatibilidad puede ser favorable en trasplantes de corazón, pulmón, intestino, páncreas e incluso córnea, mientras que en los trasplantes de hígado existen estudios contradictorios.

La compatibilidad debe ser máxima cuando se trasplanta médula para evitar que se produzca el rechazo llamado “injerto contra huésped”; un único cambio de aminoácido entre dos alelos donante-receptor es capaz de producir rechazo.

Por otra parte, existen muchos estudios que relacionan ciertas moléculas HLA, e incluso determinadas secuencias de DNA, como factores de protección y susceptibilidad a padecer enfermedades. Se ha postulado que el mimetismo molecular entre ciertos patógenos y péptidos autólogos podría desencadenar una respuesta específica autoinmune.

- **Legales:** el elevado polimorfismo del sistema HLA permite realizar estudios de paternidad, ya que es muy improbable que dos personas no relacionadas genéticamente posean los mismos antígenos HLA. Su poder de discriminación supera el de otros sistemas de proteínas.

- **Evolutivas:** el polimorfismo y el desequilibrio de ligamiento del sistema HLA sirven como herramienta para relacionar filogenéticamente grupos poblacionales humanos, alelos y loci genéticos entre diferentes especies.

## 10. EL SISTEMA HLA Y LA GENÉTICA COMPARADA DE POBLACIONES

En los últimos años, se han realizado un gran número de estudios genéticos para progresar en el conocimiento de la historia y las migraciones de las distintas razas, correlacionando estos datos con teorías antropológicas, lingüísticas y de otras disciplinas. Muchos de estos estudios genéticos se han basado en el sistema HLA.

El elevado polimorfismo y el desequilibrio de ligamiento del sistema HLA hacen que éste se haya utilizado como “herramienta” para individualizar etnias e inferir su constitución genética, sus movimientos migratorios y establecer relaciones genéticas entre poblaciones (e individuos) desde el 1<sup>er</sup> Taller Internacional HLA de Antropología (*Dausset y Colombani 1972*), en los siete Talleres Internacionales de Histocompatibilidad posteriores, y en multitud de publicaciones. En el 12<sup>o</sup> y último Taller Internacional de Histocompatibilidad de 1996, se llevaron a cabo estudios genético-antropológicos HLA sobre 128 poblaciones de todo el mundo, repartidas en regiones geográficas concretas (*Bodmer y*

*col. 1997b*). El interés creciente junto con el desarrollo y estandarización de técnicas de genética molecular para la determinación de antígenos HLA de clase II y más recientemente de clase I permite una mayor accesibilidad a estos estudios, aunque no todos rinden resultados con el mismo nivel de caracterización (serológico y genético) y son, por tanto, difíciles de comparar. La discriminación del sistema HLA se incrementa cuanto mayor sea la caracterización de los alelos en las poblaciones comparadas. Además, el estudio conjunto de frecuencias HLA y otras de sistemas menos polimórficos (ABO, MN, Rh, etc) tiende a homogeneizar las comparaciones realizadas restando fuerza de discriminación al sistema HLA (*Martínez-Laso y col. 1995*).

Las frecuencias de los alelos HLA correlacionan con la existencia o ausencia de flujo genético entre poblaciones y este puede ser “medido”, puesto que sus características HLA no se han diluido con el tiempo, mediante el estudio de sus correspondientes distancias genéticas y la presencia de haplotipos HLA con fuerte desequilibrio de ligamiento (*Imanishi y col. 1992a, b; Clayton y Lonjou 1997*). Estudios realizados en la población de San Sebastián muestran que los vascos son un aislado poblacional, no sólo cultural sino también genético, pero que mantiene muchas similitudes con los españoles, portugueses y argelinos según sus perfiles HLA y la presencia de haplotipos extendidos HLA compartidos. (*Arnáiz-Villena y col. 1995, 1997; Martínez-Laso y col. 1995*). Otro ejemplo, son las poblaciones nativas americanas (Amerindios) que poseen un restringido espectro de antígenos HLA (p.e.: B15, B35, B39, B40) respecto a los caucasoides, y cuyos subtipos alélicos sólo se han encontrado en estas poblaciones (*Gomez-Casado y col. 1997, 1999*). Asimismo, las poblaciones orientales, caucasoides y negroides muestran alelos HLA y diferencias en sus frecuencias que sirven como marcadores genéticos poblacionales.

## II. ANTECEDENTES ANTROPOLÓGICOS, ARQUEOLÓGICOS E HISTÓRICOS DE CRETA

### 1. LA ISLA DE CRETA

La isla de Creta abarca 8.331 Km<sup>2</sup> y es la mayor de las islas griegas, y de todo el Mediterráneo. Su capital Iraklio cuenta con más de 100.000 habitantes, y Creta en su conjunto tiene alrededor de 520.000 habitantes. Administrativamente, la isla se divide en cuatro prefecturas; de Oeste a Este son Chania (misma capital), Rethimnon (misma capital), Iraklio (misma capital) y Lassithi (capital Agios Nikolaos).

Se puede considerar a Creta como un pequeño continente por la variedad de su geografía, paisaje y agricultura. Sus montes centrales superan los 2.400 m de altitud (Levka Ori, Ida). En el sur descienden escarpados, formando duros acantilados, playas de piedra y golfos como el de Mesara. Por el contrario, en el norte se forman suaves playas de arena con un clima más suave, razones por las que esta zona sea la más habitada, y con mejores infraestructuras y servicios.

El nombre de Creta debe tener un origen muy antiguo; los egipcios lo llamaban Keftin, los hebreos Caftor, los babilonios Captara y los vascos Kritxa (que significa cigarra), insecto ubicuo en Creta.

### 2. ANTROPOLOGÍA

No se han encontrado huesos del hombre paleolítico en la isla, pero en algunas cuevas como la de Mianou parece haberse hallado restos arqueológicos de finales de la época magdaleniense (*McKenzie 1996*) que duró el período entre 20.000-10.000 años antes de Cristo (a. C.).

El hombre neolítico fue capaz de colonizar las islas del mar Egeo hacia el 7º-6º milenio, incluidas aquellas que como Creta, distaban más de cien kilómetros de Europa, doscientos de Asia y trescientos de África. Las primeras huellas de los pobladores neolíticos se han encontrado en las cercanías del pueblo montañoso de Magasa; los colonos aparentemente llegaron en galeras de muchos remos, parecidas a las pintadas en Egipto de la época predinástica (antes del 2700 a.C.). Debajo del palacio de Cnosos se ve que hay depósitos neolíticos que podrían ser del 12.000 a. C., pero no hay indicios de una cultura neolítica más reciente que la de Magasa; por ello se puede deducir que la oleada de población más antigua que alcanzó Creta llegó con una forma de cultura desarrollada en otro lugar y, por tanto, con unos genes HLA determinados.

La primera pregunta que ha asaltado a muchos investigadores es el origen de esta oleada de emigrantes. Las respuestas que se han dado, son muy diversas, dependen de los estudiosos que las argumentan. La hipótesis con mayor número de seguidores sitúa el punto de partida de estos pioneros navegantes, en las costas de Turquía. Desde allí seguirían la ruta de Rodas y la isla de Karpathos, una de las más cortas para acceder en una vía de primordial importancia a partir de la Edad de Bronce. Sir Arthur

Evans, descubridor del palacio de Cnosos, propone un origen egipcio de la civilización cretense. Otras hipótesis van desde la aportación de colonizadores europeos hasta influencias semíticas, amparándose en referencias mitológicas, artísticas, comerciales, etc.

Estudios antropométricos realizados en cráneos encontrados de la época Minoica (Edad de Bronce, después de 3500 a.C. hacia 2600 a. C.) muestran que la mayor parte son dolicocefalos, parecidos a los Egipcios predinásticos, del Sur y Oeste de Europa y del Norte de África (*McKenzie 1996*). El resto de cráneos son braquicefalos pertenecientes a individuos dóricos y micénicos que invadieron la isla en la mitad del segundo milenio a. C. Diversos estudios apuntan que "los cretenses de Minos pertenecían en su mayoría a la raza blanca mediterránea, pero que estaba constituida por al menos dos grupos y sus híbridos respectivos" (*McKenzie 1996*). Es decir, unos datos indicando la existencia de un lejano sustrato neolítico del dolicocefalo y un componente racial braquicefalo menos numeroso.

Donald McKenzie (1996) concluye en su estudio sobre los primeros pobladores de Creta que la mayor parte de la población era de origen norteafricano y subraya las similitudes religiosas de cretenses, sumerios y egipcios. El dice: "*una conclusión que se puede sugerir es que varias secciones de la raza mediterránea habrían adoptado antes de su migración a áreas propicias para el asentamiento desde su tierra natal en el norte de Africa, un sistema de creencias religiosas que estaban muy relacionados con su modo de vida agrícola*".

### 3. LA CIVILIZACIÓN MINOICA

Después del período neolítico (de 6100-2800 a. C), se sucedió en Creta el llamado período minoico. Este a su vez comprendió el de los Primeros Palacios (1900-1700 a. C, destruidos) y el de los Segundos Palacios (1700-1450 a. C.); los palacios reconstruidos fueron de nuevo destruidos por causas poco claras, aunque probablemente relacionadas con las invasiones de pueblos griegos procedentes del Peloponeso.

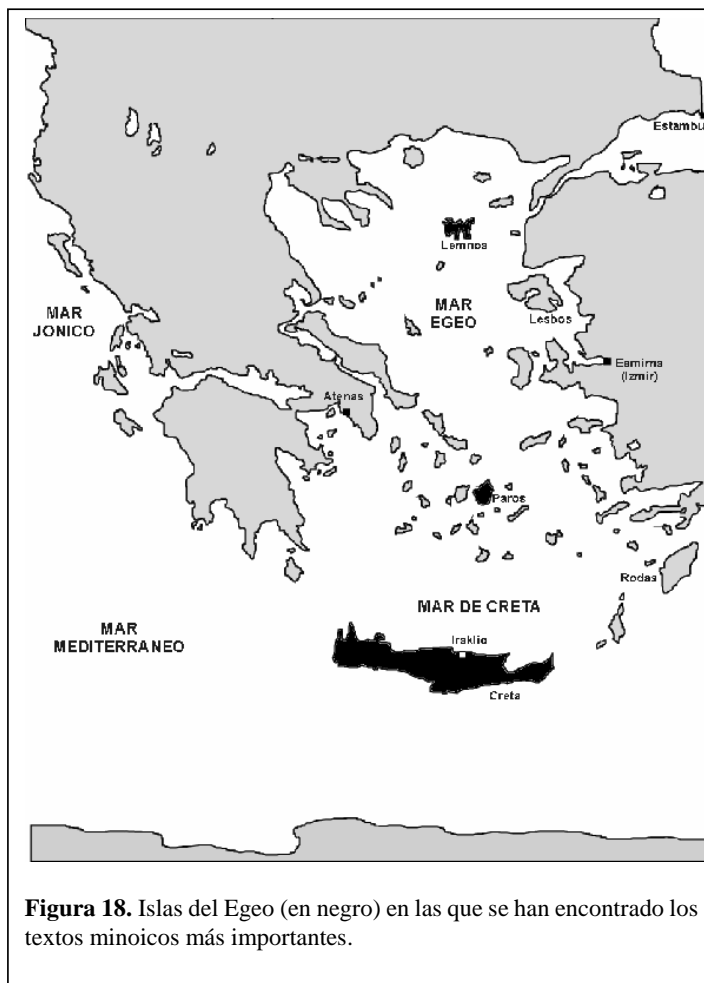
Es en el período de los Primeros Palacios de la civilización minoica cuando Creta alcanzó una influencia que se extendió hasta Egipto y Mesopotamia, donde se han hallado objetos minoicos. Según Herodoto y Tucídides, esta influencia, que alcanzaría su apogeo en la edad de bronce (2.000 a.C.), se basaba en un verdadero imperio marítimo; esto ha sido avalado por los descubrimientos arqueológicos que han tenido lugar en las islas del Mar Egeo (Melos, Cos, Rodas) y en las costas de Asia Menor (Mileto, Iasos). Es posible que el continente griego también posea restos arqueológicos minoicos (Micenos, Tirinto y Epidauro).

A finales del siglo pasado el etnólogo inglés Sir Arthur Evans, inició una serie de excavaciones en Creta, que no tardarían en poner al descubrimiento unos grandes edificios, aún no bien clasificados como palacios, templos o simples centros administrativos. Se descubren al mismo tiempo delicadas cerámicas, frescos, esculturas, objetos, que obligan a reconocer a la comunidad científica que se estaba desenterrando

una gran cultura. Después de sucesivas campañas, Evans había ido clasificando el numeroso conjunto de piezas exhumadas, y muy en concreto unos sellos, joyas, y tablillas con inscripciones escritas (*Faure 1984*), encontrándose estas últimas también en otras islas del Mar Egeo como Lemnos y Paros (Figura 18).

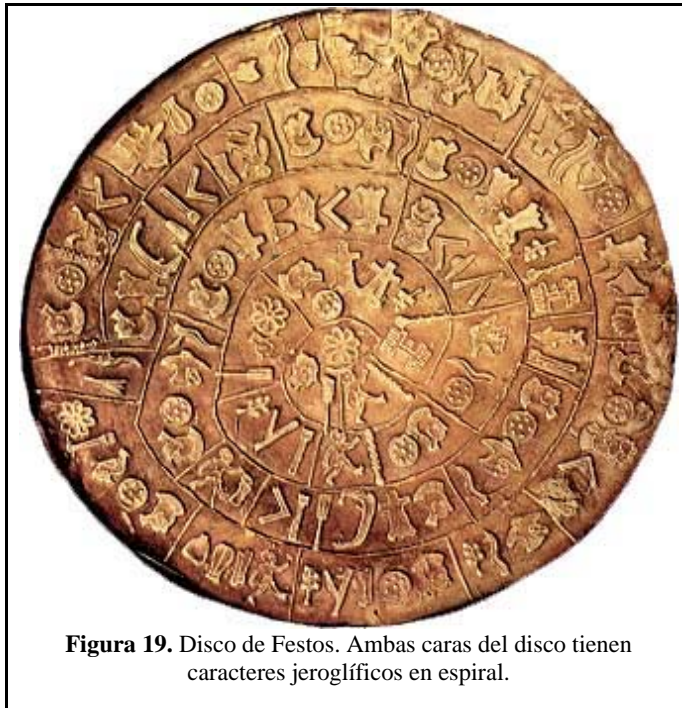
De estas tablillas se puede deducir que al final del tercer milenio (a. C) los pobladores de Creta poseían la escritura en forma de ideogramas o jeroglíficos, como los que aparecen en el disco de Festos (Figura 19). A esta escritura le sucedió el “Lineal A” utilizado en el período de los Segundos Palacios (1700-1600 a. C). Otras tablillas encontradas (más numerosas) se clasificaron como de escritura “Lineal B”, utilizadas por los primeros griegos llegados a Creta, que habrían adaptado el “Lineal A” a su cultura para prosperar en Creta.

Los minoicos construyeron Cnosos, Festos y otros palacios, así como mansiones o grandes casas



**Figura 18.** Islas del Egeo (en negro) en las que se han encontrado los textos minoicos más importantes.

por toda la isla. El principal y también el mejor conocido es Cnosos (Figuras 20 y 21), un enorme palacio



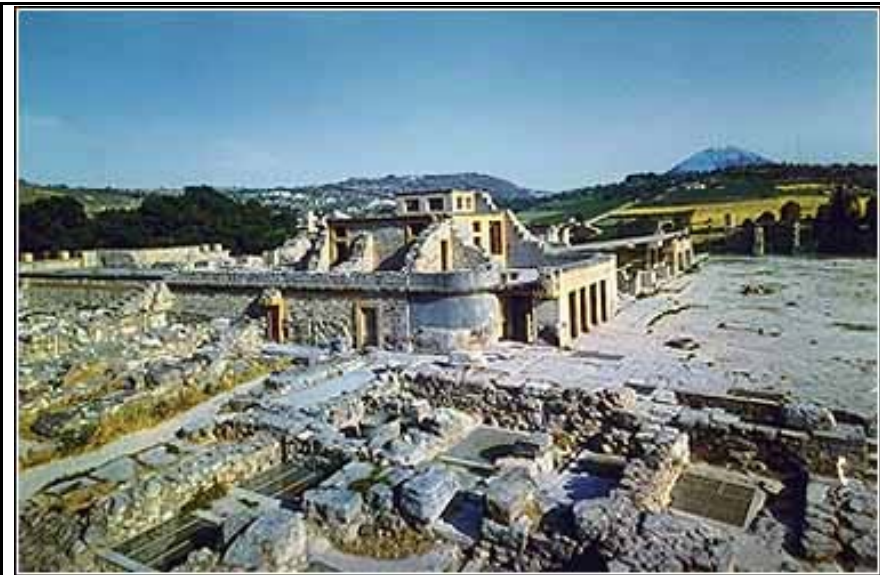
**Figura 19.** Disco de Festos. Ambas caras del disco tienen caracteres jeroglíficos en espiral.

construido sobre 25.000 m<sup>2</sup> de suelo, con 1500 estancias y cuya excavación y estudio inició Sir Arthur Evans, entre los años 1900 y 1931, una labor que aún hoy se continúa.

De los trabajos de Evans se deduce que la arquitectura general de aquellos palacios era muy sofisticada, permitiendo incluso la absorción de los movimientos sísmicos frecuentes y la preservación de los frescos pintados mediante sistemas de humidificación por capilaridad. El palacio contaba con una elaborada y compleja red de saneamiento y aguas como no se conoce hasta entonces; en los almacenes inferiores (con función de depósitos del "estado"), se guardaban miles de vasijas y cerámicas con todo tipo de productos, desde grano a aceite o vino, así como la zona del tesoro, talleres diversos, etc. Y en los varios kilómetros de pasillos y corredores, santuarios, salas del trono y dependencias, estaban los frescos, figuras escultóricas de cerámica y vidrio, joyas, etc, lo cual compone uno de los legados más antiguos y completos llegados hasta nuestros días, recogido la práctica totalidad en el Museo de Iraklio, junto al también importante legado de Festos y de otros palacios de la isla.

Creta alcanza el punto culminante de su sorprendente civilización. En sus ciudades y templos florecen casi todas las artes: pintura, cerámica, joyería, escultura, arquitectura, danza, música, representaciones de mitos, etc. Son los siglos donde se forjan las numerosas leyendas sobre el Laberinto, el Nacimiento de Zeus y de su hijo Minos (Figura 21b), se construyen los grandes santuarios, se expande el comercio en base a una agricultura con excedentes y una potente flota que encuentra los puertos de

Europa, Africa y Asia.



**Figura 20.** Restos del Palacio de Cnosos.



**Figura 21.** Reconstrucción pictórica del Palacio de Cnosos.





**Figura 21b.** Trono del Rey Minos en su estado actual (Palacio de Cnosos).

#### 4. LOS PRE-MICÉNICOS: FIN DEL IMPERIO CRETENSE

Creta sufrió la invasión pre-micénica procedente de Grecia hacia el año 1.450 a. C., teniendo en cuenta los sincronismos con otras culturas; además de la cronología proporcionada por el hallazgo de objetos egipcios en las ruinas excavadas, la datación del carbono 14 indica fechas aproximadas. No sabemos si esta llegada de guerreros promovió un flujo genético entre ambas poblaciones, fue motivo de incendios, destrucciones, y matanzas generalizadas, o si la población de la isla se sometió fácilmente a los nuevos señores.

Aún cuando los aqueos (primeros griegos indoeuropeos) se establecieron en Creta, se hablaba por los cretenses el Lineal A, según se ve por las inscripciones que han sido encontradas en la parte oriental y que pertenecen a fechas tan tardías como los siglos VI y V a. C. (*Loyadu-Platonos y Marinatau 1985*).

Homero dice que en su tiempo Creta estaba poblada con aproximadamente 100 ciudades y existían 5 razas: pelasgos, eteócritas (los más antiguos cretenses), los kidones, los aqueos y los dorios;

estos últimos procederían de Macedonia según el escritor griego Herodoto (1989). Es sólo una suposición el que la mayoría de los habitantes perteneciesen a los verdaderos y más antiguos cretenses, siguiendo la dinámica de las invasiones, donde en general prevalecen los genes (y el número) de los invadidos.

Después de las catástrofes palaciales en el período de “los segundos palacios”(erupción de Tera, cerca de 1700 a.C.) y de la primera invasión en el período “post -palacial”(1300 a. C.) de los aqueos, quienes aprendieron la navegación de los cretenses, el imperio marítimo de Creta fue destruido y continuado por los micénicos (Hägg 1986) que tomaron el lenguaje Lineal A y lo convirtieron en el Lineal B. La influencia poblacional y genética de esta invasión y otras subsiguientes no está documentada, pero podría no haber sido grande (por lo dicho anteriormente acerca de los invasores). Posteriormente, Creta queda al margen del resto de Grecia, ya que no participa en las guerras persas y se mantiene neutral en la guerra del Peloponeso (Loyadu-Platonos y Marinatau 1985). Sin embargo, las guerras internas son continuas y se hacen alianzas con Egipto y el norte de África (provincia Cirenaica), habiéndose encontrado una presencia egipcia en el islote de Lefki (Sudeste de Creta) (Marchand 1994).

## 5. HISTORIA CONTEMPORÁNEA

Desde el siglo III Creta se convirtió en el refugio de la piratería que asolaba el Mediterráneo. Fue precisamente este hecho el que atrajo la atención del Imperio Romano hacia Creta, quienes tomaron y gobernaron Creta (69-330 d.C.) cuando la isla ya contaba con 300.000 habitantes. Tras la caída del Imperio Romano, Creta se unió al Imperio bizantino (330-824 d. C.), evitando las invasiones bárbaras del norte. Sin embargo, en el siglo VII comienzan los ataques de los árabes, y en el siglo IX los árabes sarracenos llegados de España tomaron la isla, recuperada de nuevo por los bizantinos en 961 d.C. La población árabe (y por tanto los genes) que permaneció durante su invasión fue probablemente pequeña.

En el siglo XII se asientan en la isla colonos bizantinos adquiriendo un estatus aristocrático y, presumiblemente, evitando su mezcla (al menos genética) con los habitantes de Creta.

Creta fue regida durante cuatro siglos (1204 a 1669) por los venecianos y durante tres siglos (1669-1898) por los turcos otomanos. Tras sucesivas revueltas de la población cretense, las potencias europeas impusieron al gobierno turco la concesión de un estatuto autónomo a Creta. En 1912, el Parlamento de Creta se declaró favorable a la unión con Grecia; tras la derrota turca en la primera guerra balcánica, el tratado de Londres decretó la definitiva incorporación de Creta a Grecia (1913). Creta fue Base militar inglesa durante la II Guerra Mundial, en mayo de 1941 fue ocupada por 4.500 paracaidistas alemanes (batalla de Creta), que permanecieron en la isla hasta mayo de 1944.

## 6. ANTECEDENTES GENÉTICOS Y CULTURALES AL PRESENTE ESTUDIO

El estudio HLA de poblaciones iberas y norteafricanas (españoles, argelinos, vascos y portugueses) ha permitido establecer una relación de cercanía genética entre ellas y con otras del mediterráneo occidental (talianos, sardos, etc) (*Arnaiz-Villena y col. 1981, 1995, 1997; Martínez-Laso y col. 1995*). Sin embargo, se han estudiado en menor medida las relaciones entre poblaciones del mediterráneo oriental, y de estas con las occidentales (*Martínez-Laso y col. 1996*).

De entre los resultados del 12º y último Taller Internacional de Histocompatibilidad (*Clayton y Lonjou 1997*) se observó que los griegos presentan alelos HLA-DRB1 compartidos de manera casi-específica con poblaciones de Etiopía, Sudán y del oeste de África. Este punto fue pasado por alto en la comunidad internacional, y tampoco se realizaron análisis comparativos de una manera global con los datos existentes. El estudio genético HLA de las poblaciones cretense y macedonia puede indicar la presencia o ausencia de estos alelos DRB1 casi específicos en estas poblaciones, así como determinar el grado de emparentamiento con las poblaciones mediterráneas (tanto norteafricanas como caucasoides), sub-saharianas y africanas occidentales.

Las relaciones históricas entre cretenses y los primeros griegos micénicos (ya comentadas en apartados anteriores) se remontan a 2000 a. C. Por otra parte, los macedonios fueron considerados por los griegos clásicos como "bárbaros no griegos" y no pudieron participar en los Juegos Olímpicos (*Villar 1996*). El clásico griego Herodoto escribió que los macedonios eran dorios y nunca fueron admitidos en la comunidad griega (*Herodoto 1989*). Los antiguos macedonios vivieron entre el norte de Grecia (Tesalia) y Tracia en los Balcanes, y no hablaban griego. Bajo el reinado de Felipe II (357-336 a.C.), los macedonios lucharon contra los griegos derrotándoles finalmente. El imperio Macedonio se extendió desde la Península Balcánica hasta el Himalaya, y al norte de África bajo el reinado de su hijo Alejandro Magno.

Por otra parte, en la lingüística se da un paso de gigante pues se consigue descifrar, a partir del vasco, algunas antiguas lenguas pre-románicas extintas como el ibérico-tartésico de la península Ibérica y el etrusco (Etruria, Italia), el Lineal A minoico, que sorprendentemente era muy similar a los anteriores y también se consiguió descifrar a partir del vasco (*Arnaiz-Villena y Alonso-García 1998*). La antigua lengua macedonia (eslava en la actualidad) guarda similitudes con las mencionadas anteriormente. Amén de las relaciones lingüísticas, existían otras arqueológicas respecto a la cerámica y domesticación de animales en estas culturas (*Escacena-Carrasco 1996*) y las antropológicas expuestas por McKenzie (*1996*). Una vez establecidas las relaciones lingüísticas, culturales e históricas entre las poblaciones de Creta y Macedonia con otras mediterráneas, y la validez del sistema de histocompatibilidad humano (HLA) como herramienta para caracterizar individuos y poblaciones, se puede afrontar el presente estudio de la genética histórica de la población actual de la isla de Creta; los resultados genéticos HLA pueden ayudar a esclarecer o incluso modificar las relaciones históricas-prehistóricas de las poblaciones

estudiadas.

## **OBJETIVOS**

La antigua cultura minoica de Creta, junto con las previamente existentes en el resto del mediterráneo, puede ser una de las bases principales de la cultura griega y por lo tanto de la civilización occidental. Para estudiar la contribución relativa de las diferentes poblaciones mediterráneas al perfil genético HLA de la población cretense actual, se plantean los siguientes objetivos:

1. Caracterizar por primera vez el polimorfismo de los genes HLA de clase I (A y B) y de clase II (DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1 y DQB1) en una muestra representativa de la población cretense y macedonia.
2. Calcular las distancias genéticas entre los cretenses y macedonios con otras poblaciones mediterráneas, a partir de las frecuencias alélicas de los loci HLA de clase I (baja resolución) y clase II (alta resolución) en conjunto, y sólo clase II (baja y alta resolución).
3. Construir árboles filogenéticos (dendrogramas) por el método de neighbor-joining (o “vecino más próximo”), a partir de las distancias genéticas calculadas, con el fin de determinar el grado de emparentamiento de los cretenses y macedonios con otras poblaciones mediterráneas.
4. Realizar análisis de correspondencia entre las poblaciones cretense y macedonia y otras mediterráneas para observar las afinidades HLA y si existe correlación genética y geográfica.
5. Estimar las frecuencias y desequilibrios de ligamiento de los haplotipos de dos loci HLA-A-B, HLA-B-DRB1, y HLA-DRB1-DQB1, así como los haplotipos extendidos HLA-A-B-DRB1-DQA1-DQB1 característicos de la población cretense, y compararlos con los de otras poblaciones principalmente mediterráneas.
6. Asignar, si es posible, la procedencia geográfica de estos haplotipos
7. Esclarecer las relaciones genéticas HLA de los griegos con los cretenses y macedonios mediante la comparación de alelos y haplotipos.

8. Establecer, a partir de los resultados obtenidos de la comparación del objetivo anterior, las relaciones de emparentamiento y la procedencia de cretenses, griegos y macedonios clásicos.
  
9. Establecer el posible origen cultural y genético de la población cretense dentro del desarrollo de las civilizaciones del mediterráneo actual mediante las relaciones filogenéticas HLA, la historia, la antropología y la lingüística.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. POBLACIÓN ESTUDIADA.

### 1.1. SELECCIÓN DE INDIVIDUOS.

Con la colaboración de Polybios Iliakis, se seleccionaron 135 donantes de sangre voluntarios sanos no emparentados, cuyos antepasados han vivido en la isla al menos tres generaciones. Las localidades cretenses de donde procedían los donantes eran variadas y comprendían una muestra representativa de toda la isla: Iraklion, Rethimnon, Sitia, Ierapetra, Malia y Timbaki entre otras (ver figura 22).

### 1.2. RECOGIDA DE MUESTRAS.

Se procedió a la extracción de sangre periférica con un sistema de vacío (Venject, Terumo, Japón) en tubos de 10 ml que contenían EDTA-Na<sup>+</sup> como anticoagulante. Posteriormente, para cada muestra de sangre se mezclaron volúmenes iguales (7,5 ml) de sangre anticoagulada y solución conservante (SC) en tubos de polipropileno de 15 ml, que se identificaron de forma apropiada. La solución conservante impide la degradación del DNA genómico y lo mantiene en condiciones óptimas hasta su extracción.

## 2. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Se realizó de forma manual mediante extracción con fenol/cloroformo/agua (FCA). Los pasos fueron los siguientes:

-Incubación a 37°C durante 14 horas y en agitación de la siguiente mezcla:

- 15 ml de sangre periférica + solución conservante.
- 15 ml de reactivo de lisis (Applied Biosystems, CA, EE.UU).
- 1 ml de Proteínasa K (200 µg/ml)

-Una extracción con un volumen de FCA (Applied Biosystems, CA, EE.UU).

-Incubación en agitación durante 10 minutos, y posterior centrifugación a 2500 rpm a temperatura ambiente.

-Se recoge la fase acuosa (superior).

-Adición de un volumen de FCA.

-Incubación en agitación durante 10 minutos, y posterior centrifugación a 2500 rpm a temperatura ambiente.

-Se recoge la fase acuosa (superior).

-Adición de un volumen de cloroformo (Applied Biosystems, CA, EE.UU).

-Incubación en agitación durante 10 minutos, y posterior centrifugación a 2500 rpm a temperatura ambiente.

-Se recoge la fase acuosa (superior).

-Adición de dos volúmenes de isopropanol.

-Agitación suave y posterior precipitación del DNA en forma de "medusa", o bien precipitación del DNA

(aspecto de aceite) solvatado con el exceso de sal que inicialmente tenía la solución conservante.

-Dos lavados con etanol al 70% (-20°C). En el primer lavado, el DNA con aspecto de aceite forma "medusa" debido a la disolución del exceso de sal en el 30% de agua que contiene el etanol frío.

A los DNAs extraídos se les añade agua bidestilada para su resuspensión y se conservan a -20°C hasta su utilización. El cálculo de concentración del DNA se realiza sobre una mezcla compuesta de 3 µl de DNA y 297 µl de agua bidestilada (dilución 1/100). Se mide la absorbancia de esta muestra a 260 y 280 nm. Se aplica la fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{Factor de dilución} \times 50 \times A_{260}$$

La relación  $A_{260}/A_{280}$  nos indica la pureza del DNA y debe comprender un valor entre 1'6-1'8.

## 3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: Polymerase Chain Reaction), es un método de obtención de un número elevado de copias a partir de un fragmento de ácidos nucleicos de interés. Partiendo de una muestra con un sustrato DNA de cualquier origen, la PCR consiste en la repetición cíclica de tres etapas por el siguiente orden (Figura 23):

1.- Desnaturalización: consiste en la separación de cada una de las dos cadenas del DNA sustrato, efecto que se consigue al incubar la muestra a alta temperatura (93-97°C). Las dos cadenas permanecerán separadas libres en la disolución hasta que la temperatura baje lo suficiente (37-55°C) para permitir la renaturalización.

2.- Anillamiento o hibridación: en presencia de altas concentraciones de oligonucleótidos sintéticos (denominados primers o cebadores), complementarios a ciertas zonas del DNA sustrato, el descenso de temperatura previamente citado permite la hibridación de dichos cebadores a sus secuencias homólogas en el DNA sustrato. Para la amplificación de una región de DNA "diana", son necesarios por tanto dos primers, uno de ellos complementario a una de las cadenas y el otro a la antiparalela, en zonas que flanqueen el segmento de DNA que queremos amplificar. Estos primers vienen definidos, por tanto, por la secuencia del DNA sustrato, vienen a estar compuestos en la mayoría de los casos por 18-28 nucleótidos y es necesario que sus secuencias no sean complementarias entre sí.

# Mar de Creta

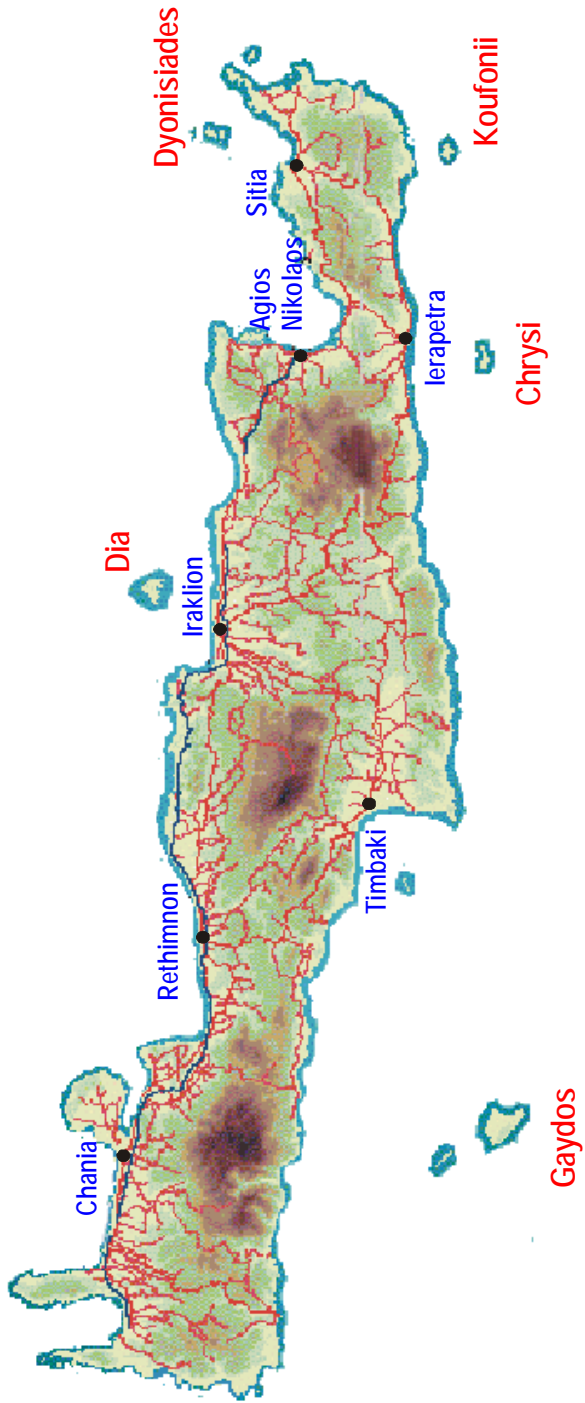


Figura 22. Localidades de Creta en cuyos habitantes se han caracterizado los alelos HLA.

3.- Elongación o polimerización: este paso consiste en la extensión, en sentido 5'→3' del complejo primer-DNA sustrato. Como enzima DNA polimerasa que incorpora los deoxinucleótidos monofosfato (dNMPs), a partir de los trifosfato (dNTPs) presentes en la disolución, se utiliza de preferencia la denominada Taq-polimerasa (extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*, Saiki y col. 1985).

3.1. OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS.

3.1.1. Síntesis de oligonucleótidos.

La síntesis de los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de amplificación se llevó a cabo en el sintetizador automático "Oligo-1000M DNA Synthesizer" (Beckman, Palo Alto, CA, EE.UU). La técnica de síntesis está basada en la denominada "química de cianoetil-fosforamidito", que consiste en la incorporación sucesiva de los diferentes nucleótidos a un soporte sólido funcionalizado, a través de tres etapas:

1) Protección de nucleósidos y funcionalización del soporte: los nucleósidos se protegen por acilación de sus grupos amino (con cloruro de benzoilo para la citidina y adenosina, y cloruro de isobutirilo para la guanosina, la timidina no necesita protección); y el bloqueo de la posición 5'-OH con p-dimetoxitritilo. Con el primer nucleósido de la secuencia (teniendo en cuenta que la síntesis ocurre en sentido 3'→5'), se funcionaliza el soporte sólido. Esto consiste en la reacción del primer nucleósido con grupos carboxilos terminales presentes en el soporte, que suele ser gel de sílice o vidrio de poro controlado.

2) Síntesis cíclica: comienza haciendo pasar a través del soporte funcionalizado una disolución de ácido tricloroacético (TCA), el cual libera el 5'-OH del nucleósido unido al soporte del grupo p-dimetoxitritilo. Seguidamente se añade el fosforamidito (reacción del nucleósido protegido con N,N-diisopropil-clorometoxifosfina) del segundo nucleótido de la secuencia. Los posibles 5'-OH que no hayan reaccionado se bloquean haciendo pasar por la columna una solución de anhídrido acético. Con una disolución de iodo se oxidan los grupos fosfitos a fosfatos obteniendo así un dímero unido al soporte por el 3'-OH. Se vuelve a pasar TCA a través de la columna, se libera la posición 5'-OH y el dímero es susceptible de admitir un tercer nucleótido. Este ciclo se repite hasta llegar a la longitud de secuencia deseada.

3) Liberación del soporte y desprotección final: al acabar el ciclo de síntesis se ha obtenido una cadena de oligonucleótido unida al soporte. Añadiendo tiofenol se liberan todos los metoxilos unidos a los átomos de fósforo y eluyendo con amoníaco concentrado queda separado el oligonucleótido del soporte sólido. La

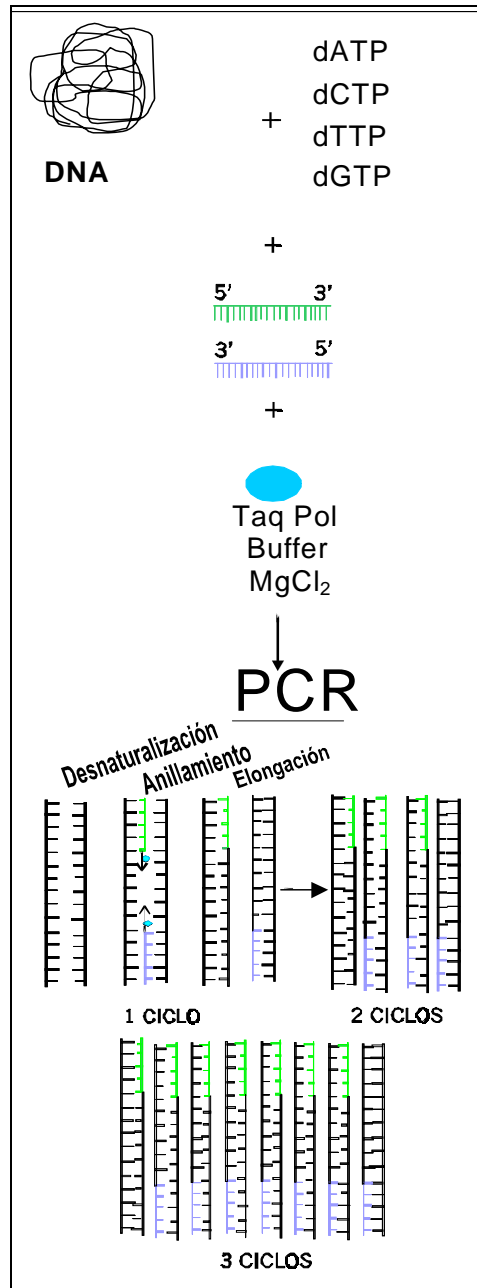


Figura 23. Primeros ciclos de una PCR.

incubación de esta disolución amoniaca a 54°C durante un tiempo de 5 a 12 horas permite la desprotección de todas las bases de la secuencia y la obtención del fragmento de DNA en solución acuosa.

### 3.1.2. Purificación de oligonucleótidos.

Existen varios métodos de purificación de oligonucleótidos. El más cómodo y rápido consiste en la utilización del llamado cartucho de purificación de oligonucleótidos (OPC; del inglés: Oligonucleotide Purification Cartridge). Se llevan a cabo los siguientes pasos:

- Inyección a través del cartucho (flujo de 1 a 2 gotas por segundo) de 5 ml de acetonitrilo grado HPLC.
- Inyección a través del cartucho (flujo de 1 a 2 gotas por segundo) de 5 ml de acetato de trietilamina (TEAA) 2 M, a pH 7.0.
- Inyección a través del cartucho de 1 ml de amoníaco, seguido del volumen de la solución de oligonucleótido obtenida (habitualmente 0.5 ml) y de 0.5 ml de agua bidestilada.
- Recoger el eluyente y hacerlo pasar de nuevo por el mismo cartucho.
- Lavar el cartucho con 5 ml de amoníaco diluido, 3 veces.
- Lavar el cartucho con 5 ml de agua bidestilada, 2 veces.
- Lavar el cartucho con 5 ml de TEAA al 2%, 2 veces.
- Lavar el cartucho con 5 ml de agua bidestilada, 2 veces.
- Inyectar al cartucho 1 ml de acetonitrilo al 20%: el eluyente que se recoge contiene el oligonucleótido purificado.
- Desecar la solución en una centrífuga conectada a vacío.

### 3.1.3. Precipitación de oligonucleótidos.

El procedimiento para eliminar las sales del oligonucleótido seco es el siguiente:

- Añadir 100 µl de acetato sódico 2M pH 4.5 y resuspender por pipeteo.
- Añadir 900 µl de etanol absoluto. Homogeneizar la mezcla. Enfriar 60 min a -70°C
- Centrifugar a 4°C a 14000 rpm. Desechar el sobrenadante a vacío o por pipeteo.
- Secar en centrífuga a vacío, teniendo cuidado de no sobresecar.
- Resuspender en 100 µl de agua bidestilada.

### 3.1.4. Medición espectrofotométrica de oligonucleótidos.

Una dilución que consta de 3 µl de oligonucleótido resuspendido en 297 µl de agua bidestilada, se mide al

espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. La concentración del oligonucleótido en la solución original se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Factor de dilución} \times A_{260}^* \times 100}{1,54A + 0,75C + 1,17G + 0,92T}$$

\* Valor de la medición a longitud de onda de 260 nm.

### 3.1.5. Oligonucleótidos empleados.

Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación y oligotipaje de los loci HLA-A y -B se muestran en las tablas 4, 6 y 7. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación de alelos de clase I y clase II se muestran en las tablas 4, 8 y 9.

## 4. AMPLIFICACIÓN Y OLIGOTIPAJE DE LOS LOCI HLA DE CLASE I

### 4.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS LOCI HLA DE CLASE I

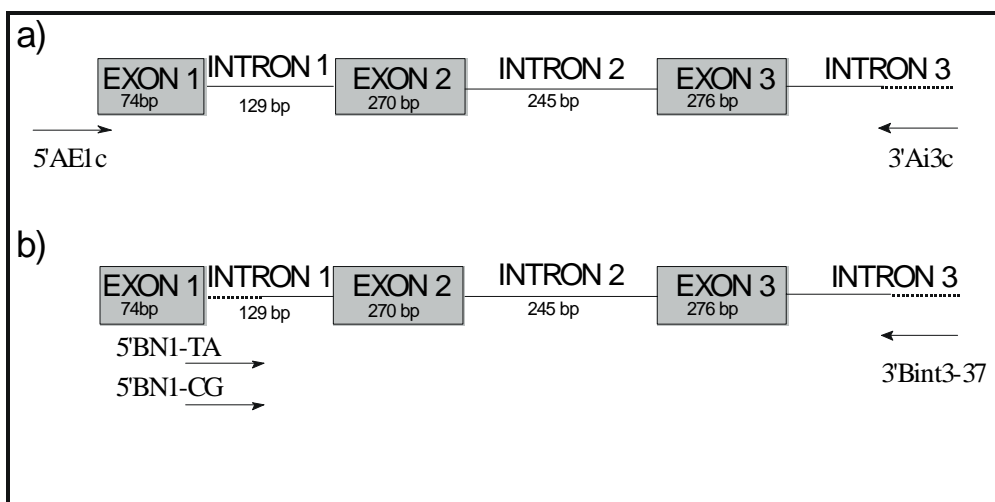
#### 4.1.1. Locus HLA-A.

A partir de las secuencias exónicas (Arnett y Parham 1995) e intrónicas (Summers y col. 1993) de los alelos HLA-A, se diseñaron primers específicos para este locus (Tabla 4). La amplificación conjunta de los dos alelos HLA-A para cada individuo estudiado, rinde fragmentos de aproximadamente 1000 pb y comprende las regiones nucleotídicas completas del exón 1, intrón 1, exón 2, intrón 2, exón 3 y el intrón 3 de forma parcial. Un esquema de la amplificación se muestra en la figura 24.

#### 4.1.2. Locus HLA-B.

La obtención de secuencias no codificantes de intrones 1, 2 y 3, permitió a Cereb y col. (1996) establecer un dimorfismo en el intrón 1 para alelos de HLA-B. En base a este dimorfismo, los alelos HLA-B pueden clasificarse en dos grupos diferenciados (ver Tabla 5). El diseño de dos primers para el extremo 5' específicos de cada grupo, y de un primer 3' genérico de todos los alelos HLA-B (ver Tabla 4), permite aplicar a un mismo DNA las dos amplificaciones de grupo. Si el DNA amplifica sólo para uno de los dos grupos, bien grupo CG bien grupo TA, indicará que los dos alelos pertenecen a este grupo. De lo contrario, el individuo será heterocigoto de grupo para HLA-B. Esta separación específica en la PCR nos va a facilitar la resolución de los alelos HLA-B en el oligotipaje.

Las amplificaciones rinden fragmentos de aproximadamente 900 pb, y comprende las regiones nucleotídicas del intrón 1 (parcial), exón 2, intrón 2, exón 3 y el intrón 3 (parcial). Un esquema de la



**Figura 24.** Esquema de las regiones amplificadas de los loci HLA de clase I: a) HLA-A y b) HLA-B.

amplificación se muestra en la figura 24.

- Todo ello en un volumen final de 100 µl.

**4.1.3. Reacciones de amplificación del DNA.**

La mezcla de reacción de PCR para amplificar HLA-A y -B a partir DNA genómico constaba de:

- DNA genómico: 1 µg
- KCl 50 mM
- Tris, pH 8.3, 10 mM
- MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM
- Gelatina 0.01%
- dATP 200 µM
- dCTP 200 µM
- dGTP 200 µM
- dTTP 200 µM
- Primer 5': 1 µM
- Primer 3': 1 µM
- Taq polimerasa, 2.5 Unidades enzimáticas (Perkin Elmer Cetus, EE.UU).

Es importante señalar que la mezcla se prepara en su totalidad excluyendo el DNA y se expone durante 15 minutos con luz ultravioleta a dos longitudes de onda: 254 y 302 nm. La irradiación fragmentaría el posible DNA contaminante, impidiendo que actúe de molde en el proceso de amplificación. Las condiciones para la amplificación de HLA-A y -B que se aplicaron en el termociclador PCR-9600 (Perkin Elmer Cetus) fueron:

- Desnaturalización previa a 96°C durante 1 minuto.
- 4 ciclos de las siguientes etapas:
  - Desnaturalización a 96°C, 15 segundos.
  - Hibridación a 72°C, 45 segundos.
  - Extensión a 72°C, 40 segundos.
- 21 ciclos de las siguientes etapas:
  - Desnaturalización a 96°C, 15 segundos.
  - Hibridación a 65°C, 10 segundos.
  - Extensión a 72°C, 1 minuto y 10 segundos.
- Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación de los loci HLA-A y HLA-B

<b>HLA-A</b>		
Primer	Secuencia 5'/3'	Localización (pb)
5'AE1c	CAGACGCCGAGGATGGC	5'UT-Exón 1 (-12 a 5)
3'AI3c	GATCAGGGAGGCCCCCG	Intrón 3 (14 a 31)
<b>HLA-B</b>		
Primer	Secuencia 5'/3'	Localización (pb)
5BN1-CG	CGGGGGCGCAGGACCCGG	Intrón 1 (59 a 76)
5BN1-TA	GGCGGGGGCGCAGGACCTGA	Intrón 1 (57 a 76)
3Bint3-37	AGGCCATCCCCG(G/C)CGACCTAT	Intrón 3 (3 a 37)

**Tabla 5.** Grupos de amplificación de los alelos HLA-B.

Grupo CG	B*13, B*15 (-1522), B*18, B*27, B*37, B*40, B*41, B*44, B*45, B*46, B*47, B*49, B*50, B*54, B*55, B*56, B*57, B*59, B*82
Grupo TA	B*7, B*8, B*14, B*1522, B*35, B*38, B*39, B*42, B*48, B*51, B*52, B*53, B*58, B*67, B*78, B*81
No clasificado	B*73

#### 4.1.4. Controles de amplificación.

La alta sensibilidad de la técnica de la PCR (pueden obtenerse más de un millón de copias de la región flanqueada por los primers utilizados), hace necesario un cuidado extremo en la manipulación de las muestras para evitar contaminaciones.

Por ello en las reacciones se introduce un control NEGATIVO, que consta de los mismos ingredientes que una reacción estándar, sustituyendo el DNA sustrato por agua bidestilada.

El control de amplificación se realizó por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración del 2%.

La electroforesis se lleva a cabo en presencia de tampón TEA 1x en una cubeta de electroforesis. En cada pocillo se cargan 7 µl de la mezcla resultante de:

- 5 µl del producto de la PCR.
- 2 µl de tampón de carga.

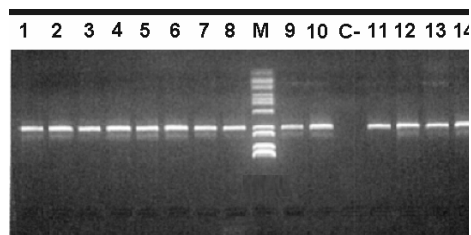
Además, se incluye un marcador de masa molecular (MW VI, Boehringer Mannheim) para identificar el tamaño de amplificación de nuestras muestras. Este se prepara tomando 2 µl del marcador, 2 µl de agua bidestilada y 1 µl de tampón de carga.

Una vez cargadas las muestras y el marcador en los pocillos, se someten a electroforesis durante 40 minutos a 130 voltios, visualizándose finalmente el resultado en un transiluminador ultravioleta (254 nm). El resultado se recoge mediante un sistema de fotografía y es el que se muestra en la figura 25.

#### 4.2. OLIGOTIPAJE DE LOS LOCI HLA DE CLASE I

El tipaje genético mediante oligosondas de DNA se denomina oligotipaje. Los oligonucleótidos se diseñan con una secuencia complementaria a cada una de las regiones polimórficas que definen alelos o grupos de alelos HLA-A y -B en las regiones exónicas e intrónicas amplificadas. La hibridación (o ausencia de hibridación) con los amplificados de HLA-A y -B se detecta por quimioluminiscencia. El conjunto de especificidades definido por cada oligonucleótido positivo y negativo, nos indicará qué antígenos HLA-A y -B presenta el

individuo estudiado.



**Figura 25.** Productos de amplificación para el locus HLA-A. (calles 1-8, 9-10 y 11-13). Además, se incluye un control negativo (C-) y un marcador de masa molecular (M).

#### 4.2.1. Oligonucleótidos empleados.

Para la determinación de alelos HLA-A se utilizaron 29 oligonucleótidos: 26 de ellos corresponden a los exones 2 y 3 (*Arguello y col. 1996*), y el resto reconocen secuencias del intrón 2 y fueron diseñados para este trabajo (ver Tabla 6). Los alelos del locus HLA-B (Tabla 7) se determinaron con la ayuda de 53 oligonucleótidos: 26 reconocen secuencias de los exones 2 y 3 (*Arguello y col. 1996*), 2 oligonucleótidos de secuencia previamente publicada (*Yoshida y col. 1992*) se pusieron a punto para reconocer especificidades Bw4/Bw6, y 22 se diseñaron para este trabajo, de los cuales 9 también reconocen secuencias de los exones 2 y 3, y los 16 restantes identifican secuencias de los intrones 1 y 2. Las Tablas 6 y 7 muestran los oligonucleótidos empleados y la especificidad de cada uno para los alelos HLA-A y -B.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos empleados en el oligotipaje del locus HLA-A.

URSTO <sup>a</sup>	Secuencia 5'	Localización <sup>b</sup>	Especificidades
2 <sup>#</sup>	GGG CCG GGC GCG GGG AGC	113-130	A*0101,*2,*3,*1101,*23,*24,*25,*26(-2602),*29,*31,*32,*33(-3302),*34,*36,*43,*66,*68,*69,*74,*80
3 <sup>#</sup>	CTC ACA GAT TGA CCG AGT	282-299	A*02011,*31,*33
4 <sup>#</sup>	CGG ATC GCG CTC CGC TAC	307-324	A*23,*24(-2404),*25,*32
5 <sup>#</sup>	TAC CTG GAG GGC CTG TGC	547-564	A*2604
6 <sup>#</sup>	CAG AGG ATG TAT GGC TGC	358-375	A*2(-0204,0207,0210,0215,0217),*25,*26,*3401,*43,*66,*6802,*69
7 <sup>#</sup>	ACA CCC TCC AGA GGA TGT	350-367	A*2(02,05,14)
9 <sup>#</sup>	CGA CGT GGG GCC GGA CCG	375-392	A*1,*11,*25,*26,*32,*3401,*36,*43,*66,*6802,*74
12 <sup>#</sup>	CCA GCA GGA CGC TTA CGA	411-428	A*25,*26(-2602),*3401,*43,*66
13 <sup>#</sup>	GTG CGT GGA CCG GCT CCG	561-578	A*1,*23,*24(-2403)
15 <sup>#</sup>	GGA GCA GTG GAG AGC CTA	531-548	A*2(0202,0203,0205),*25,*26,*3004,*3005,*3401,*43,*66,*68
16 <sup>#</sup>	GGA GCA GTT GAG AGC CTA	531-548	A*2(01,04,06,07,10,11,14,15,16,17),*0301,*23,*29,*30(-04,05),*31,*32,*33,*3402,*69,*74
17 <sup>#</sup>	GTG CGT GGA GTG GCT CCG	561-578	todos -A*2,*3003,*31,*80
18 <sup>#</sup>	GGA GCA GCT GAG AGC CTA	531-548	A*80
19 <sup>#</sup>	AGG GGC CCG AGT ATT GGG	236-253	Todos - A*2,*3003,*31,*80
24 <sup>#</sup>	ATT GGG ACC GGA ACA CAC	248-265	A*25,*26,*33,*34,*66,*68,*69
25 <sup>#</sup>	TAC CTG GAG GGC ACG TGC	557-574	A*2(-0216),*23,*24,*29,*30,*31,*32,*33,*34,*36,*68,*69,*74
26 <sup>#</sup>	TGT ATG GCT GCG ACG TGG	365-382	A*1,*2(-7,10,15,17),*3,*11,*25,*26,*2902,*30,*31,*32,*33,*34,*36,*43,*66,*68,*69,*74,*80
28 <sup>#</sup>	GCC CAG TCA CAG ACT GAC	277-292	A*3,*11,*29,*3001,*34,*66,*68,*69
29 <sup>#</sup>	ACC GAG TGG ACC TGG GGA	293-310	A*2,*3,*11,*2603,*3001,*31,*33,*34,*66,*68,*69,*74
31 <sup>#</sup>	ATT TCT ACA CCT CCG TGT	92-109	A*2(05,06,10,14),*11,*25,*26,*34,*43,*66,*68011,*69
32 <sup>#</sup>	GCC CGT GTG GCG GAG CAG	520-537	A*23,*29,*31,*32,*33,*74
37 <sup>#</sup>	AGA TAC CTG GAG AAC GGG	580-597	todos -A*3301
40 <sup>#</sup>	TCT CAC ACC CTC CAG	346-360	A*2(02,06,14,17),*23,*24
42 <sup>#</sup>	GGC GGA GCA GCG GAG A	528-543	A*1,*36
43 <sup>#</sup>	CAG GAC GCC TAC GAC GGC	415-432	A*1,*3,*11,*29,*31,*32,*33,*36,*6802,*74,*80
45 <sup>#</sup>	GAA GGA GAC GCT GCA GCG	597-614	todos
1-12 <sup>@i</sup>	AGGCGCTTAACCCGGTT	154-171 <sup>*</sup>	A*9(A*2402)
2-12 <sup>@i</sup>	CCGGGGCGCAGTTCAGG	15-32 <sup>*</sup>	A*3(A*0301)
3-12 <sup>@i</sup>	GGGCCAGGTGCCCCACAG	65-82 <sup>*</sup>	A11(A*1101)

<sup>a</sup>del Inglés, Universal Recognition Site Targeting Oligoprobe. <sup>b</sup>Posiciones respecto del alineamiento de secuencias HLA de clase I (Mason y Parham 1998). <sup>\*</sup>Posiciones respecto del alineamiento de secuencias de intrones de *Cereb* y *col*. (1996). <sup>@</sup>Oligonucleótidos descritos por *Arguello* y *col*. (1996). <sup>@i</sup>Oligonucleótidos diseñados para este trabajo. <sup>i</sup> Oligonucleótidos específicos del intrón 2 (I2). Los signos negativos entre paréntesis antes de un/los subtipo/s indican que estos no son reconocidos por su correspondiente oligonucleótido (URSTO).

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en el oligotipaje del locus HLA-B.

URSTO <sup>a</sup>	Secuencia 5'	Localización	Especificidades del grupo CG	Especificidades del grupo TA
4 <sup>#</sup>	CGG ATC GCG CTC CGC TAC	307-324	B*15(13,16,17,23,24),*2702,*4406,*4901,*57,*59	B*0803,*3801,*51,*52,*53,*58
5 <sup>#</sup>	TAC CTG GAG GGC CTG TGC	547-564	B*1303,*15,*4005,*41,*44(-04),*45,*49,*50,*56,*57	B*35,*4802,*51,*52,*53,*58
6 <sup>#</sup>	CAG AGG ATG TAT GGC TGC	358-375	B*1301,*15(02,13,16,20,21,25),*4004,*4101, *44032,*45,*49,*50	B*35(-05,12),*4802,*5104,*53,*58
7 <sup>#</sup>	ACA CCC TCC AGA GGA TGT	350-367	B*15(-02,04,07,13,16,20,21,25) 1801,*40(01,07),*4601, *47,*5602	B*1522,*38,*39(-03,06),*67
8 <sup>#</sup>	CAG AGG ATG TTT GGC TGC	358-375	B*1506,*47	---
10 <sup>#</sup>	CTC ACA TCA TCC AGA GGA	347-364	B*1301,*15(02,13,20,21,25),*4004,*44	B*35(-05),*4802,*5104,*53,*5801
11 <sup>#</sup>	TGT ATG GCT GCG ACC TGG	365-382	B*13,*15(16,20,34),*4004,*4410,*45,*49,*50,*54, *55(-04,06),*5601,*59,*8201	B*35(-05,12,16,17),*4802,*53,*58
14 <sup>#</sup>	GCG GAC ACG GCG GCT CAG	478-495	B*15(-20),*27(-053),*3702,*40,*46,*47,*5603,*57,*73	B*7,*1522,*35(092,18),48(01,03),*81
15 <sup>#</sup>	GGA GCA GTG GAG AGC CTA	531-548	B*15(01,04,07,08,11,12,14,15,19,22,24,26N,28),*46	B*1522
20 <sup>#</sup>	GGC CCG ACG GGC GCC TCC	382-400	B*1520,*4501,*49,*50	B*35(-02,12),*4802,*53(01,02),*58
22 <sup>#</sup>	TCC GCG GGC ATA ACC AGT	401-418	B*13,*15(09,30),*27(07,11),*40(-03,09),*41,*4410, *54,*55,*56(-03),*57(02,03),*59,*82	B*7,*8,*35(02,04,06,09,12,18),*38,*39(-07), *42,*48(01,03),*51,*52,*67,*78,*81
23 <sup>#</sup>	ACC AGT TCG CCT ACG ACG	413-430	B*3701,*73	B*14,*35(03,06,13),*38,*39(-07),*67
24 <sup>#</sup>	ATT GGG ACC GGA ACA CAC	248-265	B*15(02,08,09,10,11,13,15,18,22,23,29),*18,*4008, *4406,*54,*55,*56,*59,*73,*82	B*7,*8,*14,*35(-10,13,16),*38,*39(-021, 022,08),*42,*51,*53,*67,*78,*8101
25 <sup>#</sup>	TAC CTG GAG GGC ACG TGC	557-574	B*18,*37,*41,*4404,*54,*55,*59	B*8,*14,*38,*39,*42,*67
26 <sup>#</sup>	TGT ATG GCT GCG ACG TGG	365-382	B*15(02,04,13,21,25),*1802,*27(-07,11),*4101, *44(032,07)	B*14,*39062,*51(-06),*52,*78
30 <sup>#</sup>	CGG AAC CTG CGC GGC TAC	307-324	---	B*7,*8(01,04),*14,*35,*39(-07),*42,*48, *67,*78,*81
31 <sup>#</sup>	ATT TCT ACA CCT CCG TGT	92-109	---	B*7,*1401,*38,*39(-04,12),*4201,*48,*67, *8101
32 <sup>#</sup>	GCC CGT GTG GCG GAG CAG	520-537	---	B*8,*35(-11,*21),*38,*39,*42,*48, *51(05,08),*53,*58,*67,*81
33 <sup>#</sup>	GAT CTC CAA GAC CAA CAC	267-284	---	B*3520,*39(021,022,08),*48,*52,*5107
34 <sup>#</sup>	TGA CCA GTC CGC CTA CGA	411-428	---	B*35(01,05,07,08,10,11,15,16,17,19,20,21), *3907,*4802,*53,*58
35 <sup>#</sup>	AAC ACA CAG ATC TAC AAG	259-276	B*1511,*54,*55,*56	B*7,*3910,*42,*67,*8101
36 <sup>#</sup>	CGC GGC CGC CGT GGG TGG	212-229	B*54	---
41 <sup>#</sup>	ACC AAC ACA CAG ACT GAC C	277-295	B*1803	B*0703,*8(-03),*14,*39(-05,07,08,11),*7801
42 <sup>#</sup>	GGC GGA GCA GCG GAG A	528-543	B*4404	B*7(-04),*35(08,18),*39(08,11),*5105
43 <sup>#</sup>	CAG GAC GCC TAC GAC GGC	415-432	B*15(14,17),*27(-06,07,09),*3702,*44(-05),*47	



**Tabla 7 (Cont.).** Oligonucleótidos empleados en el oligotipaje del locus HLA-B.

URSTO <sup>a</sup>	Secuencia 5'	Localización <sup>b</sup>	Especificidades del grupo CG	Especificidades del grupo TA
50 <sup>@</sup>	AGGTATTTCGACACCCGCC	88-106	---	B*8
51 <sup>@</sup>	ATCTGCAAGGCCAAGGCA	268-286	B*27,*3701	---
52 <sup>@</sup>	ACGGAGCCCCGGGGCCCA	205-223	---	B*35,*1522,*51,*52,*53,*58,*78
53 <sup>@</sup>	TAGAGCAAGAGGGGGCCCG	227-245	B*18	---
54 <sup>@</sup>	GGGGCCGGAATATTGGGA	237-255	---	B*14,*38,*39,*67
55 <sup>@</sup>	GCCTGTGCGTGGAGTCGC	557-575	B*44(-04),*45	---
56 <sup>@</sup>	CCATCCAGAGGATGCTG	353-371	B*3701	---
57 <sup>@</sup>	ACACCCCTCCAGAATATGT	350-368	B*1802,*27(-07,11),*3702	---
58 <sup>@</sup>	GAGACACGGAACATGAAG	259-277	---	B*15(16,17),*57,*58
TA1 <sup>@i</sup>	CTCAGCCCCCTCCACCC	108-125	---	B*7,*4201,*4801
TA2 <sup>@i</sup>	TCGGGGGGTTCAGCCC	98-115	---	B*1402
TA3 <sup>@i</sup>	TCCCCACGGACGGCCCG	41-58	---	B*8,*1402,*4101,*4201
TA4 <sup>@i</sup>	TGAGGCCGGGGACCCCG	96-113	---	B*4201
TA5 <sup>@i</sup>	GGGCTCGGGGGACGGGG	207-224	---	B*8,*18,*27,*37,*38,*39,*4011,*4101,*4201,*57,*67
TA6 <sup>@i</sup>	CTCGGGGACGGTGCTGA	210-228	---	B*39061,*5101,*5201
TA7 <sup>@i</sup>	CGGGGACTGGGCTGACC	217-234	---	B*0702,*40012,*4002,*4801
CG1 <sup>@i</sup>	AGGAGGTCTGGCGGGTC		B*1302,*5401	---
CG2 <sup>@i</sup>	CAGCCCCCTGGCCCCC		B*1302	---
CG3 <sup>@i</sup>	CCCCGGCTGGGGCCAGG	10-27	B*15(-22),*46	---
CG4 <sup>@i</sup>	TCAGCCCCCTTGCCCC	109-126	B*18	---
CG5 <sup>@i</sup>	ATCCGCCCCGAGGCCCG		B*2705,*4011,*44031,*4701	---
CG6 <sup>@i</sup>	GTCACGCTCCTCCG	106-123	B*40012,*4101	---
CG7 <sup>@i</sup>	AGATCCACCCCCCTGAGG		B*57	---
CG8 <sup>@i</sup>	CCGCCCCCTGAGGCCCG	87-104	B*15,*18,*37,*45,*46,*49,*50	---
CG9 <sup>@i</sup>	CGGGGGGAGGTCACGAC	17-34	B*50	---
Bw4 <sup>4</sup>	GCTCTGGTTGTAGTAGCGGA	317-336	Alelos Bw4	Alelos Bw4
Bw6 <sup>6</sup>	CTCTGGTTGTAGTAGCCGC	317-336	Alelos Bw6	Alelos Bw6

<sup>a</sup>del Inglés, Universal Recognition Site Targeting Oligoprobe. <sup>b</sup>Posiciones respecto del alineamiento de secuencias HLA de clase I (Mason y Parham 1998). <sup>@</sup>Oligonucleótidos diseñados para este trabajo. <sup>i</sup>Oligonucleótidos específicos de los intrones 1 y 2. <sup>4</sup>Oligonucleótidos tomados de Yoshida y col. (1992); en estos últimos, el oligotipaje se realizó de forma idéntica a los anteriores cambiando la temperatura de hibridación a 56°C y el lavado con solución TMAC a 62°C. Los signos negativos entre paréntesis antes de un/los subtipo/s indican que estos no son reconocidos por su correspondiente oligonucleótido (URSTO).

#### 4.2.2. Marcaje no radiactivo de los oligonucleótidos.

Se utilizó el sistema comercial "Dig Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit" (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania)

Se prepara la siguiente mezcla de reacción:

Tampón (5x).....4 µl x N  
 CoCl<sub>2</sub>.....4 µl x N  
 Digoxigenina-ddUTP..... 1 µl x N  
 Terminal Transferasa..... 1 µl x N

donde N es el número de oligonucleótidos a marcar más uno. Homogeneizamos la mezcla por pipeteo y tomamos 10 µl de ésta y 10 µl (100 pmoles) de oligonucleótido. Incubamos 20 min a 37°C, y finalmente guardamos a -20°C el oligonucleótido marcado hasta su uso.

#### 4.2.3. Transferencia del producto de PCR a membranas de nylon.

Los amplificadores de los loci HLA-A y -B fueron transferidos con el aparato "Lambda dot II 60 well" (One Lambda, EE.UU) sobre membranas de nylon de 5 x 7 cm<sup>2</sup> (Hybond-N, Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra). Para ello se tomaron 50 µl del amplificado y se situaron en un tubo Beckman (Robbins Scientific, CA, EE.UU). Este paso se repite hasta un total de 60 muestras diferentes, que es el número máximo de muestras que puede el aparato dispensar automáticamente. Los tubos Beckman se sitúan en un carrier adaptable al dispensador. Este se programó para tomar 40 µl de cada tubo y dispensar 0.5 µl, de manera que se pueden obtener hasta un total de 80 réplicas. Posteriormente, las membranas se incuban con NaOH 0.4N durante 10 min para desnaturar el producto de PCR bicatenario. Después, se incuban con acetato amónico 2M durante 10 min para neutralizar los filtros. Se dejan secar a temperatura ambiente y finalmente, se exponen a luz ultravioleta (Stratalinker 2400, Stratagene, Reino Unido) durante 45 segundos a un gradiente decreciente de energía de 1200 julios.

#### 4.2.4. Hibridación de las membranas de nylon.

Este es un procedimiento para hibridar una oligosonda de DNA con los fragmentos de DNA amplificados por la técnica de PCR y transferidos a filtros de nylon. Se introdujo cada membrana rotulada con lápiz en un tubo de 50 ml (Falcon) igualmente identificado. Se añadió a cada tubo 10 ml de Solución TMAC + 10 µl del correspondiente oligonucleótido marcado. Todos los oligonucleótidos se incubaron durante hora y media en un horno con rotación continua a 54°C, excepto dos oligonucleótidos de HLA-B (Bw4 y Bw6, Tabla 7) que se incubaron a 56°C.

Posteriormente, se extrajeron las membranas de los tubos y se colocaron en un recipiente plástico para la realización de una serie de lavados, por los que se eliminará el oligonucleótido no hibridado con el DNA de la membrana. Estos fueron los siguientes:

- tres lavados de 5 min cada uno con una solución compuesta de SDS al 0.1% + SSPE 2x.
- dos lavados de 15 min cada uno con solución TMAC (500 ml) precalentada a 60°C, en un baño con agitación a la misma temperatura. Los oligonucleótidos Bw4 y Bw6 se lavaron a 62°C.
- tres lavados de 5 min cada uno a temperatura ambiente con una solución formada por SSPE 2x.

Posteriormente, se realizan varias incubaciones con el fin de preparar las membranas para la unión del anticuerpo conjugado de la digoxigenina:

- un lavado de 5 min con tampón 1 a temperatura ambiente.
- un lavado de 30 min con tampón 2 a temperatura ambiente. Este lavado bloquea la membrana para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo anti-digoxigenina.
- un lavado de 1 min con tampón 1 a temperatura ambiente.
- un lavado de 30 min a temperatura ambiente con tampón 1 + gelatina al 0.25% + anticuerpo anti-digoxigenina. La proporción es de 5ml de tampón 1 + gelatina por 1µl de anticuerpo, y se debe preparar en el momento.
- dos lavados con tampón 1 de 15 min cada uno a temperatura ambiente. Con este lavado eliminamos el exceso de anticuerpo anti-digoxigenina.

Para el revelado se realizó lo siguiente:

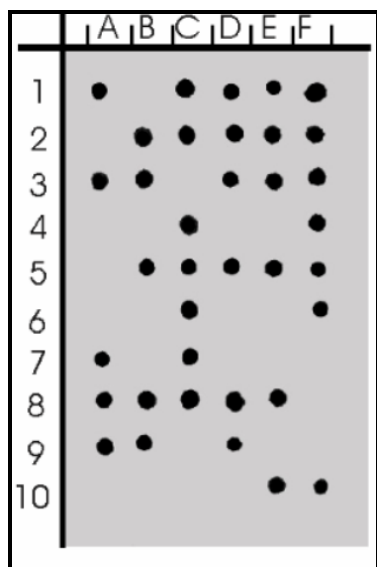
- un lavado con tampón 3 (pH 9.5) de 5 min a temperatura ambiente. Con este lavado equilibramos las membranas a pH básico para que la enzima actúe de forma eficaz.
- se prepara la solución sustrato (New England Biolabs, CA, EE.UU) compuesta de diluyente de sustrato (25x) y el propio sustrato (100x) a una concentración final de 1x, teniendo en cuenta que cada membrana requiere 2 ml de esta solución.
- se disponen las membranas en recipientes plásticos individuales o alguna superficie desechable no porosa.
- se añade la solución sustrato por encima de las membranas. Un primer contacto es suficiente para que comience la reacción de revelado.
- se colocan las membranas sobre papel secante para quitar el exceso de solución sustrato pero teniendo cuidado de que no se sobresequen.

Las membranas están listas para el revelado.

#### 4.2.5. Exposición y revelado.

El proceso de revelado por quimioluminiscencia conlleva los siguientes pasos:

- colocamos las membranas entre láminas de plástico (de conservación de alimentos). Con la superficie donde está situado el DNA hibridado hacia arriba, se fija al interior de un chasis radiográfico con papel adhesivo.
- bajo luz infrarroja, introducimos en el chasis una placa de radiografía encima de las membranas.
- Dejamos exponer la lámina de radiografía un tiempo inicial de 3 minutos.
- extraemos la placa de radiografía bajo luz infrarroja y la revelamos con un procesador rápido X-Omat (Kodak) en 2 ó 3 minutos. Si la señal observada es débil (o muy fuerte) exponemos una nueva placa de radiografía mayor tiempo (o menor tiempo) hasta obtener una imagen clara (Figura 26).



**Figura 26.** Resultado obtenido del revelado de una membrana con 60 amplificados para HLA-A, identificados mediante números y letras. Los puntos indican hibridación del amplificado con el oligonucleótido URSTO 43, que detecta A\*1, A\*3, A\*11, A\*29, A\*31, A\*32, A\*33, A\*36, A\*6802, A\*74 y A\*80.

#### 4.2.6. Deshibridación de las membranas.

Las membranas se pueden usar de nuevo tras dos lavados a 70°C con una solución de deshibridación.

## 5. AMPLIFICACIÓN Y OLIGOTIPAJE DE LOS LOCI HLA DE CLASE II.

### 5.1. LOCUS HLA-DQA1

La caracterización de los alelos de este locus se llevó a cabo con la información obtenida del 12° Workshop Internacional de Histocompatibilidad (*Bignon y Fernandez-Viña 1997*). En la Tabla 8 se muestran las secuencias de oligonucleótidos para la amplificación del exón 2 polimórfico y determinación de los subtipos alélicos.

Las reacciones de amplificación del DNA se prepararon como en el apartado 4.1.3., con las siguientes condiciones aplicadas al termociclador PCR-9600:

- Desnaturalización previa a 96°C durante 5 minutos.
- 30 ciclos de las siguientes etapas:
  - Desnaturalización a 96°C, 15 segundos.
  - Hibridación a 55°C, 20 segundos.
  - Extensión a 72°C, 30 segundos.

- Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Sobre los productos obtenidos se realizaron controles de amplificación como se describe en el apartado 4.1.4. Posteriormente, se procedió al marcaje no radiactivo de las oligosondas (ver apartado 4.2.2), transferencia de los amplificados a membranas de nylon (ver apartado 4.2.3), hibridación de las membranas con las oligosondas (ver apartado 4.2.4), y finalmente el revelado en placas de radiografía (ver apartado 4.2.5).

### 5.2. LOCI HLA-DRB Y -DQB1

La amplificación y detección de los alelos de los loci de clase II HLA-DRB (DRB1, DRB3, DRB4, DRB5) y DQB1 se llevó a cabo mediante el sistema comercial INNO-LiPA (del inglés, Line Probe Assay). Este sistema de tipaje se basa en el principio de hibridación reversa (oligotipaje reverso o dot-blot reverso). Los primers están biotinilados, y, por tanto, el DNA amplificado también. Posteriormente, el DNA amplificado se desnaturaliza y se hibrida con oligosondas inmovilizadas sobre una membrana en forma de tira. Después de la hibridación, se adiciona streptavidina conjugado con fosfatasa alcalina. Una incubación posterior con el cromógeno BCIP/NBT resulta en un precipitado púrpura en aquellas líneas donde el oligonucleótido hibridó específicamente con el DNA amplificado (Figura 27).

**Tabla 8.** Oligonucleótidos empleados en la amplificación y detección de los alelos DQA1

Primers	Codones	Secuencia 5'B'	
2DQAAMP-A	11-18	AT GGT GTA AAC TTG TAC CAG T	
2DQAAMP-B	80-87	TT GGT AGC AGC GGT AGA GTT	

Oligonucleótido	Codones	Secuencia 5'B'	Especificidades DQA1
DQA 2501	22-28	T GGC CAG TAC ACC CAT GA	0101+0102+0104+0401+05011+05012+05013
DQA 2502	22-28	T GGC CAG TTC ACC CAT GA	0103+0201+0601
DQA 2503	22-28	T GGG CAG TAC AGC CAT GA	03011+0302
DQA 3401	31-37	GA GAT GAG GAG TTC TAC G	0101+0104
DQA 3402	31-37	GA GAT GAG CAG TTC TAC G	0102+0103+05011+05012+05013
DQA 3403	31-37	GA GAC GAG CAG TTC TAC G	0401+0601
DQA 4101W	38-44	AC CTG GAG AGG AAG GAG A	0101+0102+0104+0201+03011+0302
DQA 4102	38-44	AC CTG GAG AAG AAG GAG A	0103
DQA 4103W	38-44	AC CTG GGG AGG AAG GAG A	0401+05011+05012+05013+0601
DQA 5501	51-57	TC AGC AAA TTT GGA GGT T	0101+0102+0103+0104
DQA 5502	51-57	TC CAC AGA CTT AGA TTT G	0201
DQA 5503	51-57	TC CGC AGA TTT AGA AGA T	03011+0302
DQA 5504	51-57	TC AGA CAA TTT AGA TTT G	0401+0601+05011+05012+05013
DQA 6901	66-71	ATG GCT GTG GCA AAA CAC	0101+0102+0103+0104
DQA 6902	66-71	ATC GCT GTG CTA AAA CAT	0201+03011+0302
DQA 6903	66-71	ATC GCT GTC CTA AAA CAT	0302+05011+05012+05013
DQA 6904	66-71	ATC GCT GTG ACA AAA CAC	0401+0601
DQA 7502	72-78	C TTG AAC ATC CTG ATT AA	0201+0401+0601
DQA 7504W	72-78	C TTG AAC AGT CTG ATT AA	05011+05012+05013

Este sistema es capaz de determinar la mayoría de los alelos descritos para DRB1 (n=155) y DQB1 (n=27), de acuerdo a la Nomenclatura Oficial (Bodmer y col. 1995).

### 5.2.1. Amplificación de los loci HLA-DRB y -DQB1

Para el tipaje de los alelos DRB, se realiza una amplificación del exón 2 de los alelos de los loci DRB; DRB1, DRB1 + DRB3, DRB1 +DRB4, o DRB1 + DRB5. Este sistema contiene oligosondas distribuidas en una tira para hibridar a 55°C y otra tira para 63°C, resultando en una media-alta resolución. Cuando no se obtiene la máxima resolución de los alelos DRB, el programa de interpretación *INNO-LiPA expert* nos indica que kit adicional debemos usar; *INNO-LiPA DRB1\*04* para muestras DR4, *INNO-LiPA DRB1\*15/16* para muestras DR2, o *INNO-LiPA decoder* para el resto de muestras. Estos sistemas más

específicos contienen las mismas oligosondas que kit el inicial, pero se amplifica de forma específica los alelos o grupos de alelos de interés. La información de la composición de los primers y oligosondas no la proporciona el fabricante.

De igual manera, la determinación por alta resolución de los alelos DQB1 se realiza con el sistema *INNO-LiPA DQB1*, previa amplificación del exón 2 polimórfico del locus DQB1 y posterior hibridación a 56°C con 21 oligosondas fijas de forma paralela en una tira.

Las condiciones para la amplificación de DRB y DQB1 que se aplicaron en el termociclador PCR-9600 (Perkin Elmer Cetus) fueron:

- Desnaturalización previa a 95°C durante 5 minutos.

- 35 ciclos de las siguientes etapas:
  - Desnaturalización a 95°C, 30 segundos.
  - Hibridación a 58°C, 20 segundos.
  - Extensión a 72°C, 30 segundos.
- Extensión final a 72°C, 10 minutos.

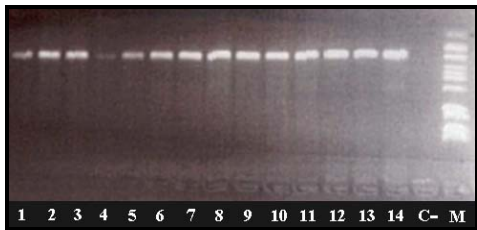
### 5.2.2. Controles de amplificación

Posteriormente, se realiza un análisis electroforético de los amplificados siguiendo las indicaciones expuestas en el apartado 4.1.4. En la figura 28 se muestra un ejemplo de una amplificación para los genes DRB1+3+4+5.

### 5.2.3. Oligotipaje de los loci HLA-DRB y -DQB1

El oligotipaje reverso se realizó mediante el aparato auto-LiPA, sistema automatizado capaz de analizar 30 muestras simultáneamente, y que consiste en un baño termo-regulable al que se adapta una bandeja con 30 compartimentos estancos, y un brazo multi-dispensador que va recorriendo la bandeja.

El auto-LiPA está diseñado para llevar a cabo los pasos de hibridación, lavados y detección por color,



**Figura 28.** Productos de amplificación para los loci HLA-DRB1+3+4+5 (calles 1-14), un control negativo (C-) y un marcador de masa molecular (M).

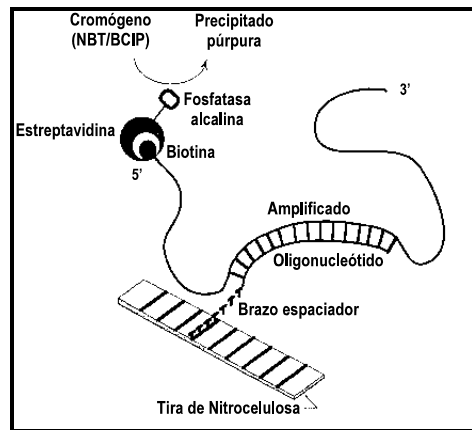
calentando y enfriando soluciones, así como dispensando y aspirando las mismas.

Previo al análisis en el auto-LiPA se realiza lo siguiente:

1. Desnaturalización de los productos de PCR. Se realiza en la bandeja-soporte mezclando 10 µl del producto amplificado y 10 µl de solución desnaturalizante proporcionada por el sistema comercial. Se deja incubar 10 min a temperatura ambiente.

2. Se preparan los siguientes reactivos:

- Solución de lavado *rinse solution*. Se diluye el stock 5x de esta solución con agua bidestilada para obtener un volumen final a concentración 1x.
- Solución de *conjugado*. Se diluye el stock 100x



**Figura 27.** Fundamento del tipaje genético de los alelos HLA-DRB y DQB1 mediante dot-blot reverso.

de esta solución con diluyente de conjugado para obtener un volumen final a concentración 1x.

- Solución de *sustrato*. Se diluye el stock 100x de esta solución con diluyente de sustrato para obtener un volumen final a concentración 1x.

Se colocan en el aparato la bandeja y los reactivos en los correspondientes conductos. Se arranca el programa pregrabado deseado para realizar el análisis.

En la figura 29 se muestra un ejemplo para DRB1, así como del tipaje obtenido con el programa informático facilitado por el distribuidor.

En el caso de obtener un patrón de bandas de hibridación anormal, advertido por el programa informático, llevaríamos a cabo el proceso de secuenciación del DNA.

## 6. SECUENCIACIÓN DE DNA.

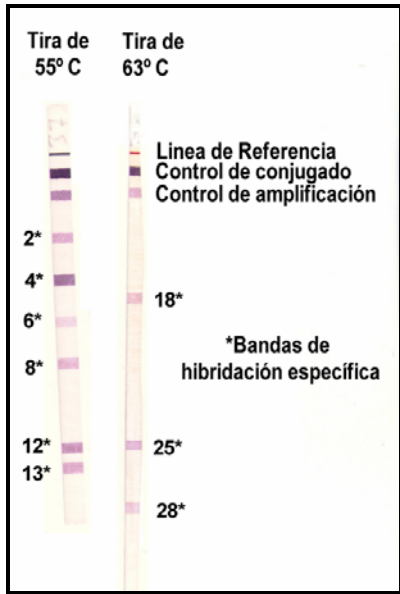
(Sambrook y col. 1989).

Se realizó sólo en aquellos casos en los que se obtuvieron resultados ambiguos por oligotipaje directo o reverso.

### 6.1. SECUENCIACIÓN MEDIANTE CLONAJE.

Este procedimiento se llevó a cabo teniendo en cuenta las siguientes premisas para los diferentes loci HLA:

- en todos los casos para HLA-A.
- para HLA-B, en aquellos DNAs que tengan alelos que pertenecen al mismo grupo de amplificación (grupos TA y CG, ver Tabla 5).



**Figura 29.** Patrón de bandas para un individuo HLA-DRB1\*0102, 1401 / DRB3\*0202 detectado mediante el sistema *INNO-LiPA*.

- en todos los casos para DQA1.
- en todos los casos para DQB1.
- para DRB1, en aquellos casos en los que los alelos pertenecen a un mismo grupo de amplificación: DR1-DR1, DR2-DR2, DR4-DR4 y DR52 asociados-DR52 asociados (Tabla 9).

Las amplificaciones se llevaron a cabo como se ha descrito previamente para los loci HLA-A, -B, -DQA1 y -DQB1, respectivamente.

Para el locus HLA-DRB1 se establecen cuatro grupos de amplificación (ver Tabla 9), y se aplicó la amplificación al grupo correspondiente según el tipaje genérico obtenido por el sistema *INNO-LiPA*.

La mezcla de amplificación de DRB1 se preparó como se detalla en el apartado 4.1.2. Los primers usados para el extremo 5' fueron 2DRBAMP-1 (DR1), 2DRBAMP-2 (DR2), 2DRBAMP-3 (DR3, DR8, DR11, DR12, DR13 y DR14) y 2DRBAMP-4 (DR4), mientras que para el extremo 3' se utilizó el común 2DRBAMP-B (Tabla 9).

Las condiciones de amplificación de DRB1 en el termociclador 9600 son:

- Desnaturalización inicial a 95°C, 5 minutos.
- 30 ciclos de
  - desnaturalización a 96°C, 15 segundos.
  - anillamiento a 58°C, 20 segundos.
  - extensión a 72°C, 30 segundos.
- Extensión final a 72°C, 10 minutos.

Los controles de amplificación se realizaron siguiendo el apartado 4.1.4.

**6.1.1. Purificación de productos de PCR.**

De la amplificación de los DNAs es necesario eliminar el exceso de sales, primers y productos de amplificación no deseados, ya que van a interferir en reacciones enzimáticas posteriores.

En este proceso se utilizó el sistema comercial "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN, Hilden,

**Tabla 9.** Nomenclatura y localización de primers para la amplificación específica de grupos HLA-DR.

Amplificación DR	Codones	Secuencias 5'β'
<b>DR1</b>		
2DRBAMP-1	8-14	TTC TTG TGG CAG CTT AAG TT
2DRBAMP-B	87-94	CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT
<b>DR2</b>		
2DRBAMP-2	7-13	TTC CTG TGG CAG CCT AAG AGG
2DRBAMP-B	87-94	CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT
<b>DR4</b>		
2DRBAMP-4	6-13	GT TTC TTG GAG CAG GTT AAA C
2DRBAMP-B	87-94	CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT
<b>DR52 asociados</b>		
2DRBAMP-3	5-12	CA CGT TTC TTG GAG TAC TCT AC
2DRBAMP-B	87-94	CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT

Alemania). Este se basa en la adsorción del DNA amplificado a una membrana de sílica-gel fija en una columna. La unión del DNA se produce a pH menor o igual a 7.5 y alta concentración de sales, mientras los contaminantes fluyen a través de la columna. El desarrollo del proceso es el siguiente:

- Se prepara un gel de agarosa al 2% (ver Soluciones Empleadas) al que se adapta un peine de 12 pocillos con capacidad para cargar hasta 80  $\mu$ l.

- Se somete a electroforesis el total del volumen de la PCR. Se aplica un voltaje de 130 voltios durante 40 minutos. Las bandas de amplificación que queramos purificar deben verse en el transiluminador claramente separadas.

- Preparamos un baño de agua a 60°C.

- Se recorta con un bisturí estéril el fragmento de agarosa que contenga la banda que nos interese. El fragmento recortado se debe aproximar lo más posible al tamaño de la banda.

- Se introduce el fragmento recortado en tubo de 1.5 ml tipo eppendorf.

- Añadimos 300  $\mu$ l de tampón de solubilización.

- Introducimos los tubos en el baño de agua a 60°C durante 10 minutos, o hasta que la agarosa se haya disuelto completamente. En este tiempo, agitamos en 2 ó 3 ocasiones ligeramente el tubo para mezclar.

- Preparamos las columnas de purificación. Estas van sobre tubos de recolección de 2 ml.

- Aplicamos la mezcla a la columna y centrifugamos a 14000 rpm, 1 minuto. En este paso el DNA amplificado queda retenido en la membrana de la columna y el resto de componentes eluyen al tubo de recolección.

- Desechamos el eluido y aplicamos en la columna 500  $\mu$ l más de tampón de solubilización. Se centrifuga a 14000 rpm, 1 minuto.

- Desechamos el eluido y aplicamos en la columna 750  $\mu$ l de tampón de lavado. Esperamos 5 minutos y centrifugamos en las mismas condiciones anteriores.

- Desechamos el eluido y centrifugamos de nuevo en las mismas condiciones para eliminar los posibles restos de etanol del tampón de lavado. El etanol es un inhibidor de la Taq polimerasa.

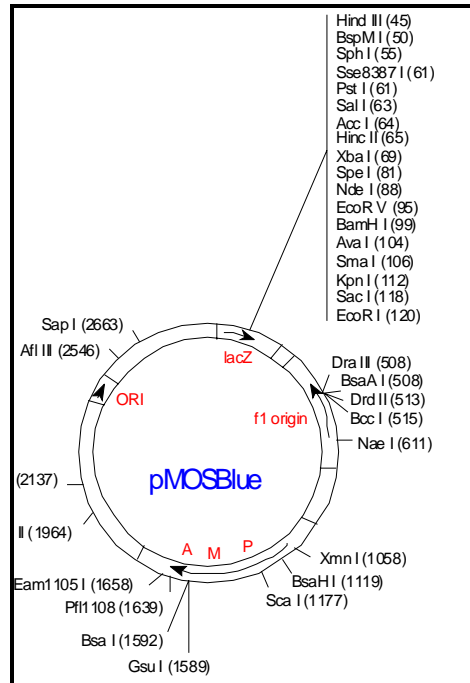
- Colocamos la columna en un tubo de 1.5 ml tipo eppendorf y aplicamos 50  $\mu$ l de agua bidestilada al centro de la membrana.

- Centrifugamos a 14000 rpm, 1 minuto. La solución acuosa eluída contiene el producto de PCR purificado.

Antes de proseguir con cualquier reacción enzimática sobre el purificado, es conveniente estimar el rendimiento del proceso. Para ello preparamos una mezcla de 5  $\mu$ l del producto purificado y 2  $\mu$ l de tampón de carga. Se somete a electroforesis en el gel de agarosa de purificación, si este se preparó con un peine más de pocillos pequeños. La intensidad de la banda nos indica la eficiencia del proceso de purificación.

### 6.1.2. Ligado en el vector de clonaje.

Se llevó a cabo mediante el sistema comercial "pMOSBlue T-vector" (Amersham LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, Inglaterra). Las estrategias de ligado y clonaje de este sistema se basan en el aprovechamiento de la capacidad de la Taq polimerasa, independiente de sustrato, de añadir una deoxiadenosina



**Figura 30.** Vector utilizado para el clonaje de los productos de PCR.

al extremo 3' de todas las moléculas de doble cadena generadas en la reacción de PCR. Estos extremos 3'-dA se usan para insertar el producto de la PCR directamente en un vector específicamente diseñado con extremos 5'-dT en el lugar de inserción. La figura 30 representa el mapa del vector utilizado.

Las reacciones de ligado se prepararon del siguiente modo:

- 1  $\mu$ l de tampón de ligado 10x.
- 0.5  $\mu$ l 100mM DTT.
- 0.5  $\mu$ l 10 mM ATP.
- 1.0  $\mu$ l del vector (50ng/ $\mu$ l).
- 0.5  $\mu$ l de T4 DNA ligasa (4u/ml).
- 3.5  $\mu$ l de agua bidestilada estéril.
- 3  $\mu$ l del producto de PCR purificado.

Es recomendable incluir en cada experimento de

clonaje dos reacciones de ligado control que nos indiquen la estabilidad del vector y la actividad de la T4 DNA ligasa. En el primer caso, se sustituye el producto de PCR por agua bidestilada. En el segundo control se incluye 2 µl de un fragmento con extremos 3'-dA y 1 µl extra de agua bidestilada con el fin de que la suma de volúmenes sea 10 µl.

Las reacciones de ligado se incuban a 15°C durante una noche, y posteriormente se guardan a -20°C.

### 6.1.3. Transformación de bacterias competentes.

El sistema "pMOSBlue T-vector" contiene una cepa de bacterias *E. Coli* ya competentes, denominada INVαF'. La transformación se realiza de la siguiente manera:

- Descongelar en baño de hielo los tubos necesarios con bacterias competentes (20 µl).
- Colocar en este baño las reacciones de ligado.
- Añadir 1 µl de reacción de ligado a cada tubo de bacterias competentes. Agitar los tubos suavemente con los dedos para homogeneizar las mezclas.
- Incubar durante 30 min en el hielo.
- Incubar en un baño a 42°C durante 40 segundos.
- Pasar de nuevo a hielo. Incubar 2 minutos.
- Añadir 80 µl de un medio rico (SOC) a temperatura ambiente. Este medio es proporcionado por el kit.
- Agitar en un incubador a 37°C, una hora y a 225 rpm.
- Preparar placas de Petri con agar LB, ampicilina (50 mg/ml), X-gal (50 mg/ml) e IPTG (100 mM). Se puede preparar con anterioridad 40 placas de siembra (ver Soluciones Empleadas).
- Poner en hielo los viales de células transformadas.
- Extender 50 µl de la suspensión bacteriana en cada placa de Petri convenientemente identificada.
- Incubar invertidas en una estufa a 37°C, hasta el día siguiente.

Para evaluar la eficiencia de las bacterias competentes se realiza un control de transformación de bacterias, usando 1 µl de un plásmido superenrollado control (proporcionado por el kit) y con resistencia a ampicilina.

### 6.1.4. Selección, confirmación y crecimiento de clones recombinantes.

Con la introducción de ampicilina y X-gal en las placas de cultivo, es posible hacer una selección de las bacterias transformadas, y de entre ellas, elegir las que poseen el plásmido recombinante por presentar un color blanquecino frente a los clones no recombinantes. A estos últimos, la integridad del gen cuya proteína metaboliza el X-gal les confiere un color verde-azulado.

El resultado de los controles de autoligado y transformación (citados anteriormente) nos orienta de la eficiencia del experimento:

- La placa de autoligado debe contener sólo un 1-8% de colonias blancas.
- La placa de control de inserto debe presentar un 95% de colonias blancas recombinantes.
- La placa de control de transformación debe presentar por cada 5 µl sembrados una eficiencia de  $4 \times 10^7$  transformantes/µg de plásmido superenrollado.

Con el fin de asegurarnos que los clones de color blanco son realmente recombinantes, realizamos con cada una de las muestras el siguiente procedimiento en campana de flujo laminar:

- Pinchamos entre 20 y 30 colonias blancas y una colonia azul por placa.
- Se pincha la colonia blanca con una punta estéril y se resuspende por pipeteo en 10 µl de PBS.
- Se toman 5 µl de la resuspensión y se llevan a 50 µl de Tween 20 (0.01%) situados en tubos de PCR.
- Estos tubos se colocan en el termociclador y se incuban a 100°C durante 15 min. El resultado es un lisado bacteriano que deja libre el DNA plasmídico.
- Preparamos una mezcla de PCR como se describe en el apartado 4.1.3. Como primers de amplificación se usaron:  
M13Forward: TGTAACACGACGGCCAG y  
M13Reverse: CAGGAAACAGCTATGACC
- Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- desnaturalización previa, 1 min a 96°C.
- 30 ciclos de las siguientes etapas:  
desnaturalización a 96°C, 15 segundos.  
hibridación a 50°C, 20 segundos.  
extensión a 72°C, 40 segundos.
- Extensión final a 72°C, 40 segundos.

El resultado de la amplificación se somete a electroforesis (ver apartado 4.1.4). Para un clon no recombinante es un tamaño pequeño de amplificación delimitado por la distancia en pb entre las dianas de M13. Por el contrario, el producto de PCR de un clon recombinante presenta un tamaño que es la suma del caso anterior y del tamaño del fragmento insertado.

En la PCR de control de inserto se incluye un control (todos los componentes sin lisado y con agua bidestilada), si en la electroforesis no se observa amplificado entonces indica ausencia de contaminación.

Para crecer la selección de clones recombinantes se prepara medio LB líquido con ampicilina (50 mg/ml), y se inoculan los 5 µl restantes de suspensión del clon en PBS. Se incuban toda la noche a 37°C y en agitación a 250 rpm.



### 6.1.5. Purificación de recombinantes.

La purificación de plásmidos a partir de pequeños volúmenes de cultivos bacterianos se conoce con el nombre de "minipreps". Los plásmidos de los cultivos obtenidos de la última incubación se purificaron con un sistema comercial llamado "QIAwell 8 plasmid Kit" (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), que se basa en el procedimiento de la "lisis alcalina" bacteriana y en la retención del DNA plasmídico en una membrana en función de la fuerza iónica. El procedimiento fue el siguiente:

- Tomar 1.7 ml de cultivo bacteriano a un tubo de microcentrífuga tipo eppendorf.
- Centrifugar a 14000 rpm, 2 minutos para bajar las bacterias.
- Aspirar a vacío el sobrenadante.
- Añadir 300 µl de tampón P1 a 4°C. Resuspender las bacterias por agitación con vortex. El tampón P1 contiene RNAsa.
- Añadir 300 µl de tampón P2. Invertir los tubos 6 veces e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. En este paso se produce la lisis alcalina.
- Añadir 300 µl de tampón P3 a 4°C. Invertir los tubos 6 veces e incubar en baño de hielo durante 10 minutos. En este paso las proteínas precipitan.
- Centrifugar 30 minutos a 4°C y 14000 rpm para bajar el precipitado de proteínas. En el sobrenadante queda el plásmido junto con sales y otras impurezas.
- Se prepara un soporte de metacrilato (QIAvac 6S, QIAGEN, Hilden, Alemania) con capacidad para adaptar hasta 96 columnas de purificación.
- Adaptamos tantas columnas de purificación como muestras tengamos y aplicamos 850 µl del sobrenadante obtenido en el paso anterior. Conectamos el aparato a un sistema de vacío de manera que se produce un flujo a través de la columna, en la queda retenido el DNA plasmídico.
- Añadimos 2 ml de tampón de lavado a cada columna.
- Se desconecta el vacío.
- Hasta ahora los líquidos eluidos recogidos en una batea interna se desechan.
- Se sustituye esta batea interna por otra en la que se incluyen tubos de recolección que se adaptan a cada columna por su parte inferior.
- Añadimos 500 µl de tampón de elución a cada columna y aplicamos de nuevo vacío.
- Precipitamos el DNA plasmídico eluido con 350 µl de isopropanol.
- Centrifugamos 15 minutos a 14000 rpm (4°C) para obtener el pellet de DNA plasmídico.
- Retiramos el sobrenadante por aspiración a vacío.
- Eliminamos el exceso de sales mediante un lavado con 1 ml de etanol al 70% (-20°C).

- Centrifugamos 5 minutos a 14000 rpm (4°C) para fijar el pellet al fondo del tubo.
- Aspiramos el sobrenadante y secamos el DNA en centrífuga de vacío.
- Resuspendemos el DNA en 25 µl de agua bidestilada.
- El cálculo de concentración del DNA plasmídico se realiza sobre una mezcla compuesta de 3 µl de DNA y 297 µl de agua bidestilada (dilución 1/100). Se mide la absorbancia de esta muestra a 260 y 280 nm. Se aplica la fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{Factor de dilución} \times 50 \times A_{260}$$

La relación  $A_{260}/A_{280}$  nos indica la pureza del DNA y debe comprender un valor entre 1'6-1'8.

### 6.2. SECUENCIACIÓN DIRECTA.

Se basa en la determinación de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de interés sin realizar previamente, mediante el proceso de clonaje, el aislamiento de cada una de las copias amplificadas de dos genes, ya que esta separación se obtiene por el uso de primers específicos de alelos o grupos de alelos.

Este procedimiento se aplicó a aquellos DNAs que cumplían las siguientes características:

- DNAs con alelos HLA-B que pueden separarse por amplificación específica de grupo según la Tabla 5 (p. e.: B35 y B18).
- DNAs con alelos DRB1 que pueden separarse por amplificación específica de grupo, es decir, todos aquellos DNAs con tipajes heterocigotos para DR1, DR2, DR4 o DR52 asociados.

La mezcla de reacción y las condiciones del termociclador utilizadas para la amplificación del locus HLA-B fueron las que se describen en los apartados 4.1.2 y 4.1.3, respectivamente.

Para la obtención de amplificadores del locus DRB1, se aplicaron a un mismo DNA los primers específicos de grupo (Tabla 9). Las mezclas de reacción y condiciones aplicadas al termociclador fueron las descritas en los apartados 4.1.3 y 6.1, respectivamente.

Los controles de amplificación se realizaron siguiendo el apartado 4.1.4.

El proceso de purificación de productos de la PCR se realizó como se describe en el apartado 6.1.1.

### 6.3. REACCIONES DE SECUENCIACIÓN.

Estas siguen básicamente el modelo descrito por Sanger (*Sanger y col. 1977*). Sobre esta base se han venido desarrollando diferentes químicas de secuenciación que van desde el uso de enzimas termoestables a enzimas más procesativas (pero

termolábiles), y que son capaces de incorporar nucleótidos marcados con isótopos radiactivos o fluoresceinados.

Para este trabajo se utilizó el sistema comercial "ABI PRISM™ Dye Terminator" (Perkin Elmer, Foster City, CA, EE.UU) que combina una enzima termoestable modificada (AmpliQ<sup>®</sup> DNA polymerase, FS) con dideoxiterminadores fluoresceinados. El proceso de copia se realiza en un termociclador 9600, mientras que la electroforesis y lectura láser de los productos resultantes se realiza de forma automática en un secuenciador de DNA modelo 373A (Perkin Elmer, Foster City, CA, EE.UU) con capacidad para 48 muestras simultáneas.

### 6.3.1. Reacciones de secuenciación en el termociclador.

En las reacciones de secuenciación se incorporan los fluoróforos cada vez que se añade a la cadena un dideoxinucleótido marcado y convenientemente modificado ("dye-deoxi-terminator") para terminar la reacción en lugar de un deoxinucleótido estándar.

De este modo, se generan de forma aleatoria copias monocatenarias fluoresceinadas con tamaños que difieren entre sí en una sola base de longitud. Estas copias llevan como última base uno de los cuatro posibles dideoxiterminadores.

Para la secuenciación de DNA plasmídico se prepara la siguiente mezcla:

Pre-mezcla ..... 8 µl  
 (mezcla de: dye terminadores (A, C, G y T ),  
 dITP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl pH 9.0,  
 MgCl<sub>2</sub>, pirofosfatasa termoestable y AmpliQ<sup>®</sup>  
 polimerasa FS)  
 Primer (3.2 pmoles/µl)..... 1µl  
 DNA .....5 µl  
 Agua bidestilada .....6 µl

En la secuenciación directa de un producto de PCR la mezcla es:

Pre-mezcla ..... 8 µl  
 (igual que el anterior)  
 Primer (3.2 pmoles/µl)..... 1µl  
 Producto de PCR..... 11 µl

Los pasos que se programan en el termociclador son los siguientes:

- Desnaturalización, 2 minutos a 95°C.
- 25 ciclos de:
  - Desnaturalización, 10 segundos a 96°C.
  - Hibridación, 5 segundos a 50°C.
  - Extensión, 4 minutos a 60°C.

Los primers de secuenciación utilizados para HLA-A, -B, -DQA1 y -DRB1 se muestran en las tablas 4, 8 y 9, respectivamente. Para el locus DQB1 se utilizaron los primers de secuenciación universales M13 (ver apartado 6.1.4).

### 6.3.2. Purificación de las reacciones de secuenciación.

Este procedimiento de purificación es necesario con el fin de eliminar el exceso de "terminadores" marcados no incorporados a las secuencias. Para ello se siguieron los pasos:

- Centrifugación del soporte de PCR con el fin de recoger el volumen condensado sobre las paredes superiores de los tubos.
- Tomamos todo el volumen del microtubo de PCR y lo llevamos a un tubo tipo eppendorf.
- Añadimos 3 µl de acetato sódico 2M pH 4'5 y 60 µl de etanol absoluto. Mezclamos por agitación.
- Incubamos en baño de hielo 10 minutos.
- Centrifugamos a 14000 rpm (4°C) durante 20 minutos. Aspiramos el sobrenadante.
- Lavamos el precipitado con 250 µl de etanol al 70% (-20°C).
- Aspiramos el sobrenadante y secamos en centrifuga de vacío. Los dideoxiterminadores no incorporados son eliminados en la aspiración.

Las muestras pueden guardarse a -20°C y en oscuridad hasta su desarrollo electroforético.

## 6.4. DESARROLLO ELECTROFORÉTICO DE LOS PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN; DETECCIÓN Y OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS.

Los cristales de secuenciación se lavan con detergentes que no produzcan residuos y agua caliente, frotando con un pedazo de papel blando (tissue). Se aclaran abundantemente con agua del grifo y, cuando ya no quedan restos de detergente, con agua bidestilada. Finalmente se lavan con etanol al 95% y se dejan secar en posición vertical.

Una vez secos, se prepara el sandwich cristal-espaciadores-cristal. Se sellan los laterales y el fondo con cinta adhesiva plástica. A la solución de acrilamida filtrada, se le añaden 500 µl de persulfato de amonio al 10% y 45 µl de TEMED. Se agita suavemente y se carga entre los dos cristales, en posición vertical y cuidando que no se formen burbujas. Cuando el interior de los cristales está lleno hasta dos cm del borde superior, se sitúan en posición horizontal, se coloca el peine de secuenciación y se fija con tres pinzas metálicas. El conjunto se deja polimerizar de 1 a 2 horas.

Una vez polimerizada la acrilamida, se retiran las pinzas, el peine y la cinta adhesiva. Se lava abundantemente con agua del grifo y finalmente con etanol al 95%. A continuación se coloca en el interior

de la cubeta del secuenciador automático 373A (Applied Biosystems). Una vez puesto el cristal, y comprobada la lectura del láser se rellenan con tampón TBE 1x las cubetas de electroforesis superior e inferior. Se conectan los cables de tensión, se limpian los pocillos de restos de acrilamida y se realiza una carrera previa de electroforesis durante 30 minutos, a 1500 voltios, 20 mA, 30 vatios.

Las muestras, preparadas como se ha descrito anteriormente, se resuspenden en 1 µl de EDTA pH 8.0, 50 mM y 5 µl de formamida desionizada.

Se mezcla con cuidado y repetidamente para conseguir la resuspensión. A continuación se centrifugan los tubos unos segundos para recoger todo el líquido en el fondo. Se calientan durante 2 minutos a 90°C para desnaturalizar el DNA y se meten inmediatamente en hielo. Así están listas para ser cargadas en los pocillos del gel. Una vez cargadas, se someten a electroforesis en las mismas condiciones que la pre-carrera, durante 14 horas.

En el secuenciador, se programan los nombres de las muestras introducidas en cada pocillo. Pasados unos 15-20 minutos desde que comenzó la electroforesis definitiva se da orden de recogida de datos. Un rayo láser excita a las moléculas que pasan, y éstas, al llevar fluorocromos conjugados, emiten en una determinada longitud de onda (diferente según que haya terminado en A, C, G ó T). La emisión se filtra por los cuatro colores posibles, se fotomultiplica y se envía al ordenador.

Acabada la electroforesis, el ordenador integra todas las emisiones fluorescentes recibidas, normaliza el espacio entre las diferentes señales y realiza una asignación de bases. El resultado se conserva en un fichero en el disco duro y se produce una impresión en colores por medio de una impresora a color. La secuencia se puede editar en pantalla y ser recogida por el operario. La figura 31 muestra un resumen del proceso.

**7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

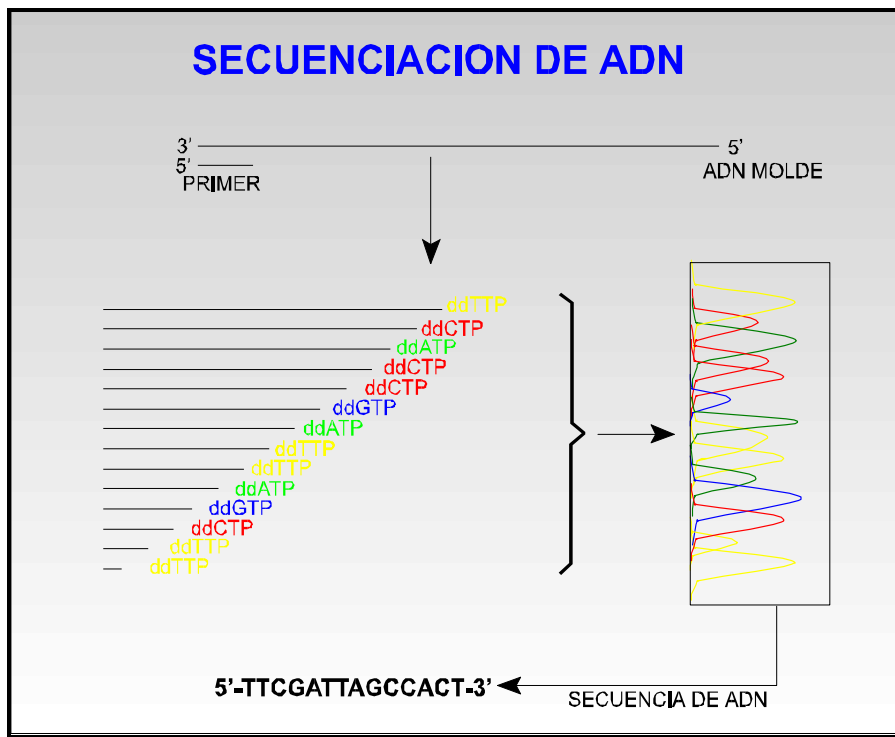


Figura 31. Esquema simplificado de una reacción de secuenciación y del resultado obtenido.

Los genotipos HLA de clase I y II caracterizados en los 135 individuos estudiados se analizaron mediante los programas informáticos Arlequin v1.1 (Excoffier y Slatkin 1995; <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>), y Vista v5.0 (Young y Bann 1996; <http://forrest.psych.unc.edu>) en un computador personal.

### 7.1. CÁLCULO DE FRECUENCIAS ALÉLICAS.

La frecuencia de cada alelo se obtuvo mediante el programa Arlequin v1.1, que realiza el conteo de cada alelo y lo divide entre el número total de genotipos (n=270).

### 7.2. POBLACIONES COMPARADAS.

Las poblaciones cuyos datos HLA se comparan en este trabajo son las siguientes (ver Figura 32 de Resultados):

Población	N	Referencias
Cretenses	135	Presente trabajo
Marroquíes (El Bereberes (Agadir) <sup>#</sup>	98	Gómez-Casado y col. 2000
Judíos (Marruecos)	94	Izaabel y col. 1998
Españoles (Madrid)	176	Roitberg-Tambur y col. 1995
Vascos (S. Sebastián)	80	Martínez-Laso y col. 1995
Portugueses (Coimbra)	236	Arnaiz-Villena y col. 1997
Franceses	179	Imanishi y col. 1992b
Argelinos (Argel)	102	Arnaiz-Villena y col. 1995
Sardos	91	Imanishi y col. 1992b
Italianos	284	Imanishi y col. 1992b
Judíos (Ashkenazi)	80	Martínez-Laso y col. 1996
Judíos (no Ashkenazi)	80	Martínez-Laso y col. 1996
Macedonios (Skopje)	172	Arnaiz-Villena y col. 2001a
Griegos (islas del Griegos (Ática)	85	Clayton y Lonjou 1997
Griegos (Chipre)	96	Clayton y Lonjou 1997
Libaneses (NS) <sup>1</sup>	101	Clayton y Lonjou 1997
Libaneses (KZ) <sup>2</sup>	59	Clayton y Lonjou 1997
Iraníes	93	Clayton y Lonjou 1997
Turcos (Estambul)	100	Mehra y col. 1997
Armenios	228	Arnaiz-Villena y col. 2001b
Egipcios (oasis de Oromo (Etiopía)	105	Imanishi y col. 1992b
Amhara (Etiopía)	101	Clayton y Lonjou 1997
Fulani (Burkina Faso)	83	Clayton y Lonjou 1997
Rimaibe (Burkina Faso)	98	Clayton y Lonjou 1997
Mossi (Burkina Faso)	38	Clayton y Lonjou 1997
Bosquimanos (San)	39	Clayton y Lonjou 1997
Senegaleses	42	Clayton y Lonjou 1997
Negroides sudafricanos	77	Imanishi y col. 1992b
	192	Imanishi y col. 1992b
	86	Imanishi y col. 1992b

N = n° de individuos analizados. <sup>@</sup> lengua árabe. <sup>#</sup> lengua bereber (Marruecos). <sup>1</sup>NS= Niha el Shouff. <sup>2</sup>KZ=Kazar Zubian

### 7.3. DISTANCIAS GENÉTICAS Y DENDROGRAMAS.

A partir de las frecuencias alélicas de los diferentes loci considerados se calcularon las distancias genéticas entre las poblaciones (Nei 1972), y posteriormente se construyeron dendrogramas o árboles filogenéticos con el paquete informático DISPAN (Otta 1993), que incluye dos programas; GNKDST es el que calcula las distancias genéticas en las poblaciones comparadas y TREEVIEW el que representa el dendrograma mediante el método de neighbor-joining (NJ o el vecino más próximo, Saitou y Nei 1987). Además, para cada dendrograma se realizó el test de bootstrap (Efron 1982; Felsenstein 1985) que nos da idea de la bondad estadística del árbol mediante un proceso iterativo. Se construyeron tres dendrogramas a partir de las distancias genéticas calculadas teniendo en cuenta los siguientes conjuntos de datos:

- frecuencias alélicas de los loci HLA-A y -B (baja resolución), y del locus HLA-DRB1 (alta resolución).
- frecuencias alélicas del locus HLA-DRB1 (alta resolución).
- frecuencias alélicas de los loci HLA-DRB1 y -DQB1 (baja resolución).

### 7.4. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA.

Este análisis se realizó con el programa informático VISTA (Visual Statistics System, V5.0), que se basa en la representación geométrica bidimensional de las diferencias estadísticas entre las poblaciones comparadas, de acuerdo a la inercia, parámetro similar a la varianza en los componentes principales, de las frecuencias alélicas, y las distancias genéticas entre las poblaciones (Nei 1972) calculadas con el programa GNKDST. Se realizaron tres análisis de correspondencia con los siguientes datos:

- frecuencias alélicas de los loci HLA-A y -B (baja resolución), y del locus HLA-DRB1 (alta resolución).
- frecuencias alélicas del locus HLA-DRB1 (alta resolución).
- frecuencias alélicas de los loci HLA-DRB1 y -DQB1 (baja resolución).

### 7.5. ESTIMACIÓN DE HAPLOTIPOS Y DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.

La muestra de población cretense analizada corresponde a individuos sanos no relacionados y no a familias. Por tanto, desconocemos cuales son las asociaciones alélicas o haplotipos reales formados por los alelos HLA (por su segregación en la familia). Para

suplir este inconveniente se establece un estudio estadístico que estima las asociaciones o haplotipos formados por alelos de diferentes loci.

El cálculo de haplotipos, su desequilibrio de ligamiento, la frecuencia de los mismos y el valor estadístico de significación  $p$  para cada asociación se realizó mediante el programa informático Arlequin (versión 1.1), que combina el algoritmo de expectación-maximización (EM) con el método de máxima probabilidad (maximum-likelihood, ML). Este es un proceso iterativo que persigue estimados de máxima probabilidad de frecuencias haplotípicas, obtenidos a partir de datos genotípicos de varios loci cuando su distribución gamética es desconocida. El principio del algoritmo EM es el siguiente:

- 1) cálculo inicial aleatorio de frecuencias haplotípicas.
- 2) uso de estos estimados para computar las frecuencias genotípicas esperadas para cada fenotipo, asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg (paso de expectación).
- 3) las frecuencias genotípicas relativas sirven como pesos para los dos haplotipos que se constituyen en un procedimiento de contaje génico, dando lugar a nuevos estimados de frecuencias haplotípicas (paso de maximización).
- 4) se repiten los pasos 2 y 3 hasta que las frecuencias de los haplotipos alcanzan el equilibrio.

La probabilidad de los datos observados ( $Q$ ) con las frecuencias haplotípicas calculadas ( $r$ ), viene dada por:

$$L(Q|r) = \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^{S_i} G_{ij}$$

donde la suma es sobre "n" individuos de la muestra y el producto sobre todos los posibles genotipos.

Dos o más alelos de loci diferentes se consideran asociados o en desequilibrio de ligamiento cuando aparecen juntos en un mismo cromosoma con mayor frecuencia de la que cabría esperar del producto de las frecuencias génicas de los alelos implicados. El desequilibrio de ligamiento ( $D$ ) se define matemáticamente como  $D_{ab} = F_{Hab} - (F_a F_b)$ , donde  $F_{Hab}$  es la frecuencia del haplotipo  $ab$  en la población,  $F_a$  es la frecuencia alélica de  $a$ , y  $F_b$  es la frecuencia alélica de  $b$ . Los haplotipos con  $D < 0$  tienden a no estar juntos formando otros haplotipos, mientras que las asociaciones con  $D > 0$  indican que los alelos que componen los haplotipos tienden a formar estos y no otros. Los haplotipos con valores de  $D > 0$  pueden a su vez tener una probabilidad estadísticamente significativa para un grado de libertad de  $p < 0.05$ , es decir, existe un 95% de probabilidad de que la asociación de alelos que forman el haplotipo es real y no se debe al azar. En este trabajo se describen aquellos

haplotipos de dos loci con desequilibrio de ligamiento positivo ( $D > 0$ ) y  $p < 0.05$ .

Los haplotipos extendidos HLA-A -B -DRB1 -DQB1 fueron deducidos a partir de:

- a) la estimación obtenida con el programa Arlequin, aunque para haplotipos de más de 2 loci no se puede testar la significación estadística. Por esto, además, se tuvieron en cuenta:
- b) haplotipos de 2 loci estimados en cretenses y otras poblaciones (*Imanishi y col. 1992b; Clayton y Lonjou 1997, y referencias del apdo. 7.2*).
- c) haplotipos extendidos que en cretenses aparecen en 2 ó más individuos siempre que el otro haplotipo en cada individuo se encuentre bien definido en otras poblaciones (*Imanishi y col. 1992b; Clayton y Lonjou 1997, y referencias del apdo. 7.2*).

## 8. SOLUCIONES EMPLEADAS.

### • Acrilamida al 40%

Para 100 ml de solución, pesar:  
-38 g de acrilamida.  
-2 g de bis-acrilamida.

Disolver por agitación magnética a temperatura ambiente en unos 90 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Añadir 10 g de resina de intercambio iónico y dejarla actuar durante 30 minutos. Filtrar por 0.2  $\mu$ m y enrasar a 100 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

### • Ampicilina (20 mg/ml)

Disolver 500 mg de ampicilina en 25 ml de etanol al 80%.

### • Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

Disolver por agitación magnética 1 g de Bromuro de Etidio en 100 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Alicuotar en tubos protegidos de la luz. Se debe manejar con mucha precaución porque es mutagénico.

### • Deshibridación, solución de

10 mM Tris pH 8.0 + 10% de SDS.

### • EDTA 0.5 M, pH 8.0

Disolver 186.1 g de etilendiaminoacetato-2H<sub>2</sub>O en 800 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH (~20 g de lentejas de NaOH). Esterilizar en autoclave.

### • Formamida desionizada

El día de uso, pesar 5 g de resina AG 501-X8 (Biorad) por cada 100 ml de formamida. Agitar con imán durante 30 minutos. Eliminar la resina filtrada por papel de filtro normal.

#### ♣ **Geles de secuenciación**

(Gel al 6% de acrilamida y 8.3 M de urea)

Se mezcla:

- 50 g de urea
- 15 ml de acrilamida al 40%
- 10 ml de TBE 10x.
- enrasar a 100 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

#### ♣ **Geles de agarosa al 2%**

- Se pesan 6 gramos de agarosa "Sigma tipo II" (Sigma, St. Louis, MO) .
- Se disuelven completamente por ebullición en 300 ml de agua bidestilada y 6 ml de tampón TEA 50x.
- Se realiza un enfriamiento rápido bajo el grifo en constante agitación manual hasta alcanzar una temperatura de 50°C aproximadamente.
- Se añade 15 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml).
- Se agita para homogeneizar la mezcla y se vierte sobre una bandeja de metacrilato. Previamente se habrá colocado un "peine" que sirve de molde para crear los pocillos donde se carga la muestra de DNA.
- El enfriamiento a temperatura ambiente de la mezcla hace que el gel polimerice por completo.

#### ♣ **IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside)**

Disolver 2 g de IPTG en 8 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Ajustar el volumen a 10 ml y esterilizar por filtración (0.2 µm). Alicuotar en volúmenes de 1 ml y guardarlas a -20°C.

#### ♣ **Medio LB**

Para 1 litro, pesar en un Erlenmeyer:

- 10 g de Bacto-Triptona.
- 5 g de Bacto-Yeast Extract.
- 10 g de NaCl.

Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada y ajustar el pH a 7.5. Ajustar el volumen final a 1 litro y autoclavar.

#### ♣ **NaCl 5M**

Disolver 292.2 g de NaCl en 1 litro de H<sub>2</sub>O bidestilada. Autoclavar la solución.

#### ♣ **NaOH 0.4M**

Pesar 16 g de NaOH y disolver en 1 litro de H<sub>2</sub>O bidestilada.

#### ♣ **NH<sub>4</sub><sup>+</sup>Ac<sup>-</sup> 2M**

Pesar 154 g de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>Ac<sup>-</sup> y disolver en 1 litro de H<sub>2</sub>O bidestilada.

#### ♣ **PBS**

Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl y llevar a 1 litro. Esterilizar en autoclave.

#### ♣ **Placas de siembra**

Para 1 litro mezclar:

- Medio LB y 12 g de Bacto-Agar.
- Autoclavar y dejar enfriar a 40°C aproximadamente.
- Añadir ampicilina (50 µg/µl), X-gal (50 mg/ml) e IPTG (100 mM).
- Repartir 25 ml de esta mezcla por placa de Petri y dejar enfriar. Cerrar las placas con Parafilm y guardar a 4°C hasta su uso.

#### ♣ **SDS 10%**

Pesar 100 g de dodecilsulfato sódico y disolver en 1 litro de H<sub>2</sub>O bidestilada mediante agitación magnética.

#### ♣ **Solución Conservante (SC)**

Dimetilsulfóxido al 25% saturado con NaCl.

#### ♣ **SSPE 20x**

Disolver en 1 litro de H<sub>2</sub>O bidestilada 175.3 g de NaCl + 27.6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O + 7.4 g de EDTA.

#### ♣ **Tampón 0**

100 mM TRIS pH 7.5.  
150 mM NaCl.

#### ♣ **Tampón 1**

Tampón 0 + 0.1% de Tween 20.

#### ♣ **Tampón 2**

Tampón 0 + 1% de Blocking Reagent (Boehringer Mannheim). Ajustar a pH 7.5.

#### ♣ **Tampón 3**

100 mM Tris pH 9.5.  
100 mM NaCl.  
100 mM MgCl<sub>2</sub>.

^ **Tampón de carga**

Se mezcla (V:V) glicerol y Rojo Cresol (500µg/ml). El primero proporciona la densidad optima para que no difunda la muestra al cargarla en el gel de agarosa, mientras el segundo proporciona el color rojo-anaranjado que nos sirve para visualizar el progreso de la electroforesis.

^ **TBE 10x, Tampón (Tris-Borate/EDTA)**

Disolver en 1 litro de H<sub>2</sub>O bidestilada 100 g de Tris + 55 g de ácido bórico + 8.3 g de EDTA. El pH debe estar entre 8.2 y 8.4. Filtrar por 0.22 µ.

^ **TEA 50x, Tampón (Tris-Acetate/EDTA)**

Tris 2 M pH 8.0+ ácido acético glacial 1 M + EDTA 0.1 M. Filtrar por 0.22 µ.

^ **TMAC, Solución (Tetramethylammonium chloride)**

Solución compuesta de TMAC 3M + 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 0.5 M EDTA + 0.1% SDS.

^ **Tris 2M pH 7.5**

Disolver H<sub>2</sub>O bidestilada 254 g de Tris- HCl + 47.2 g de Tris-Base. Ajustar el pH a 7.5. Enrasar a 1 litro.

^ **Tris 2M pH 8.0**

Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada 177.6 g de Tris-HCl + 106 g de Tris-Base. Ajustar el pH a 8.0. Enrasar a 1 litro.

^ **Tris 2M pH 9.5**

Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada 177.6 g de Tris-HCl + 106 g de Tris-Base. Ajustar el pH a 9.5. Enrasar a 1 litro.

^ **X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)**

Disolver X-gal en dimetilformamida para hacer una solución a 20 mg/ml. Alicuotar y guardar protegido de la luz a -20°C.

# **RESULTADOS**



## 1. ALELOS DEL SISTEMA HLA ENCONTRADOS EN LA POBLACIÓN CRETENSE

En la Tabla 10 se muestran los alelos HLA obtenidos por técnicas de genética molecular en una muestra de población de 135 individuos sanos no relacionados. Estos fueron escogidos de diferentes partes de la isla y sus familias han vivido en ella desde varias generaciones; son por tanto representativos del conjunto de la isla de Creta.

## 2. DISTRIBUCIÓN DE ALELOS HLA OBTENIDOS EN LA POBLACIÓN CRETENSE

### 2.1. Frecuencias alélicas de los loci HLA de clase I

En la Tabla 11 se muestran las frecuencias alélicas de los loci HLA de clase I (HLA-A y -B) obtenidos en la muestra de población analizada. Los alelos de estos loci fueron detectados mediante oligotipaje directo; este sistema es capaz de distinguir 21 alelos para el locus A y 41 alelos para el locus B, lo que supone una resolución media-baja. Sin embargo, es una resolución mayor que la obtenida en el último Taller Internacional de Histocompatibilidad: 21 alelos para el locus A y 35 alelos para el locus B (*Clayton y Lonjou 1997*).

#### **Locus HLA-A**

Los alelos que se encuentran en mayor porcentaje son A2 (25.5%), A24 (15.0%) y A1 (12.0%). Los antígenos A28 (0.5%) no pudieron ser asignados a uno de sus variantes alélicas A68 o A69. Por otra parte no se han detectado, en la muestra de población estudiada, los alelos HLA-A34, A66 (ambos del grupo A10), A74 (del grupo A19), A36 y A43. HLA-A36, A43 y A66 son característicos de poblaciones negroides africanas.

#### **Locus HLA-B**

Los alelos encontrados con mayor frecuencia para este locus son B35 (24.4%), B51 (10.2%), B18 (7.5%) y B7 (7.0%). No se han detectado los alelos HLA-B45 (del grupo B12), B75/B76/B77 (del grupo B15), B54/B56 (del grupo B22), B42, B46, B47, B48, B59, B67, B71/B72 (del grupo B70) y B73. Algunos de estos alelos ausentes como B42, B48, B59, B67 y B73 son característicos de poblaciones negroides africanas.

**Tabla 10.** Alelos HLA de clase I y II obtenidos por técnicas de oligotipaje directo y reverso en una muestra de población cretense.

Nº	Alelos HLA clase I			Alelos HLA clase II						
	A*	B*	Bw4/6	DRB1*	DRB3*	DRB4*	DRB5*	DQA1*	DQB1*	
1	26, 26	55, 55	6, 6	0101, 1401	0202	----	----	01, 01,	0501, 05031	
2	02, 24	15, 52	4, 4	0701, 15021	----	0103/11	0102	0201, 0102	02, 0502	
3	02, 26	35, 37	4, 6	1401, 1601	0202	----	0201/2	01, 0102	0502, 05031	
4	24, 68	15, 35	4, 6	1104, 1302	0202, 0301	----	----	0102, 0501	0301, 0604	
5	02, 24	52, 52	4, 4	1601, 15021	----	----	0102, 0201/2	0102, 0103	0502, 06011	
6	01, 25	08, 55	6, 6	03011, 1302	0101, 0301	----	----	0102, 0501	02, 0604	
7	03, 11	07, 18	6, 6	1104, 1501	0202	----	0101	0102, 0501	0602, 0301	
8	02, 25	49, 51	4, 4	0701, 1501	----	0103/11	0101	0102, 0201	02, 0502	
9	02, 23	35, 51	4, 6	0402, 1301	0101	0103/11	----	03, 0103	0302, 0603	
10	26, 01	07, 38	4, 6	1303, 1502	0101	----	0102	0102, 0501	0602, 0301	
11	03, 32	07, 51	4, 6	1501, 0101	----	----	0101	0102, 01	0501, 0602	
12	01, 23	08, 35	6, 6	03011, 1101	0202, 0202	----	----	0501, 0501	02, 0301	
13	02, 26	15, 40	6, 6	1302, 1305	0301, 0201	----	----	0102, 0501	0301, 0604	
14	68, 24	39, 51	4, 6	0401, 1103	0202	0103/11	----	03, 0501	0301, 0302	
15	24, 03	35, 39	6, 6	1001, 0405	----	0103/11	----	01, 0201	02, 0501	
16	03, 03	14, 35	6, 6	0403, 0404	----	0103/11, 0103/11	----	03, 03	0301, 0302	
17	01, 24	18, 18	6, 6	0403, 1104	0202	0103/11	----	0201, 03	02, 0301	
18	03, 25	14, 51	4, 6	0102, 1103	0202	----	----	01, 0501	0501, 0501	

**Tabla 10.** Alelos HLA de clase I y II obtenidos por técnicas de oligotipaje directo y reverso en una muestra de población cretense.

Nº	Alelos HLA clase I			Alelos HLA clase II						
	A*	B*	Bw4/6	DRB1*	DRB3*	DRB4*	DRB5*	DQA1*	DQB1*	
19	03, 03	51, 51	4, 4	0101, 1201	0202	----	----	01, 0501	0301, 0501	
20	23, 23	35, 53	4, 6	0101, 1101	0202	----	----	01, 0501	0301, 0501	
21	26, 11	35, 35	6, 6	0101, 1601	----	----	0201/2	01, 0102	0501, 0502	
22	02, 11	40, 35	6, 6	0405, 0402	----	0103/11, 0103/11	----	03, 03	02, 0302	
23	11, 23	35, 35	6, 6	1001, 1104	0202	----	----	01, 0501	0301, 0501	
24	02, 02	07, 35	6, 6	1101, 0802	0202	----	----	0401, 0501	0301, 0401	
25	23, 01	35, 35	6, 6	0402, 1104	0202	0103/11	----	03, 0501	0301, 0302	
26	02, 24	14, 18	6, 6	1103, 1502	0202	----	0102	0102, 0501	0301, 0502	
27	23, 23	44, 44	4, 4	0701, 0803	----	0103/11	----	0201, 0401	02, 0301	
28	03, 31	57, 57	4, 4	03011, 0701	0202	0103/11	----	0201, 0201	02, 02	
29	01, 26	08, 35	6, 6	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301	
30	02, 03	49, 51	4, 4	0402, 12021	0202	0103/11	----	03, 0501	0301, 0302	
31	29, 24	08, 55	6, 6	1302, 1001	0301	----	----	01, 0102	0501, 0604	
32	01, 03	13, 35	4, 6	0701, 1301	0101	0103/11	----	0103, 0201	02, 0603	
33	02, 01	08, 08	6, 6	03011, 03011	0101, 0202	----	----	0501, 0501	02, 02	
34	33, 33	07, 14	6, 6	0102, 1401	0202	----	----	01, 01	0501, 05031	
35	23, 29	35, 53	4, 6	1401, 1502	0202	----	0102	01, 0103	05031, 06	
36	11, 02	44, 44	4, 4	0701, 1401	0202	0103/11	----	01, 0201	02, 05031	

**Tabla 10.** Alelos HLA de clase I y II obtenidos por técnicas de oligotipaje directo y reverso en una muestra de población cretense.

Nº	Alelos HLA clase I				Alelos HLA clase II						
	A*	B*	Bw4/6	DRB1*	DRB3*	DRB4*	DRB5*	DQA1*	DQB1*		
37	23, 30	51, 58	4, 4	1302, 0402	0301	0103/11	----	0102, 0302	0604, 0302		
38	02, 23	14, 58	4, 6	0701, 1104	0202	0103/11, 0103/11	----	0201, 0501	02, 0301		
39	01, 29	08, 39	6, 6	03011, 1103	0101, 0202	----	----	0501, 0501	02, 0301		
40	02, 11	37, 37	4, 4	1001, 1101	0202	----	----	01, 0501	0501, 0301		
41	02, 03	18, 57	4, 6	0701, 1101	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301		
42	02, 02	07, 07	6, 6	0701, 13031	0101	0103/11	----	0201, 0501	0301, 03032		
43	02, 29	35, 35	6, 6	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301		
44	03, 68	14, 14	6, 6	0405, 1501	----	0103/11	0101	0102, 03	0502, 0302		
45	02, 30	18, 18	6, 6	03011, 1601	0202	----	0201/2	0102, 0501	02, 0502		
46	02, 02	18, 18	6, 6	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301		
47	02, 32	13, 51	4, 4	1104, 1501	0202	----	0101	0102, 0501	0301, 0602		
48	24, 24	15, 35	6, 6	0101, 1401	0202	----	----	01, 01	0501, 05031		
49	02, 24	18, 58	4, 6	03011, 1101	0202, 0202	----	----	0501, 0501	02, 0301		
50	32, 32	14, 40	6, 6	12021, 1101	0202, 0202	----	----	0501, 0501	0301, 0301		
51	24, 24	44, 44	4, 4	0701, 1101	0202	0103/11	----	0201, 0501	0301, 02		
52	29, 68	07, 55	6, 6	1101, 1001	0202	----	----	01, 0501	0301, 0501		
53	26, 29	35, 53	4, 6	03011, 0701	0101	0103/11	----	0201, 0501	02, 02		
54	24, 30	38, 51	4, 4	03011, 0701	0101	0103/11	----	0201, 0501	02, 02		

**Tabla 10.** Alelos HLA de clase I y II obtenidos por técnicas de oligotipaje directo y reverso en una muestra de población cretense.

Nº	Alelos HLA clase I			Alelos HLA clase II						
	A*	B*	Bw4/6	DRB1*	DRB3*	DRB4*	DRB5*	DQA1*	DQB1*	
55	24, 32	14, 51	4, 6	0402, 0405	----	0103/11, 0103/11	----	03, 03	02, 0302	
56	24, 24	49, 50	4, 6	1101, 1101	0202, 0202	----	----	0501, 0501	0301, 0301	
57	02, 26	08, 35	6, 6	03011, 1104	0202, 0202	----	----	0501, 0501	02, 0301	
58	01, 02	52, 55	4, 6	1102, 1502	0202	----	0102	0103, 0501	0301, 06011	
59	02, 02	07, 35	6, 6	1104, 1401	0202, 0202	----	----	03, 0501	0301, 0302	
60	30, 24	18, 18	6, 6	03011, 1101	0202, 0202	----	----	0501, 0501	02, 0301	
61	02, 02	18, 51	4, 6	1104, 1104	0202, 0202	----	----	0501, 0501	0301, 0301	
62	01, 02	07, 51	4, 6	1101, 1104	0202, 0202	----	----	0501, 0501	0301, 0301	
63	26, 33	35, 51	4, 6	0402, 1601	----	0103/11	0201/2	03, 0102	0302, 0502	
64	01, 02	18, 18	6, 6	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301	
65	02, 32	07, 38	4, 6	1302, 1501	0301	----	0101	0102, 0102	0602, 0604	
66	02, 02	52, 53	4, 4	1502, 1601	----	----	0102, 0201/2	0201, 0102	0502, 06011	
67	33, 33	14, 14	6, 6	0102, 03011	0202	----	----	01, 0501	02, 0501	
68	33, 11	07, 08	6, 6	03011, 1001	0202	----	----	01, 0501	02, 0501	
69	01, 11	35, 51	4, 6	03011, 0403	0202	0103/11	----	03, 0501	02, 0301	
70	24, 24	18, 49	4, 6	1104, 1104	0202, 0202	----	----	0501, 0501	0301, 0301	
71	02, 24	35, 38	4, 6	1101, 1601	0202	----	0201/2	0102, 0501	0301, 0502	
72	03, 24	35, 35	6, 6	0101, 1001	----	----	----	01, 01	0501, 0501	

**Tabla 10.** Alelos HLA de clase I y II obtenidos por técnicas de oligotipaje directo y reverso en una muestra de población cretense.

Nº	Alelos HLA clase I				Alelos HLA clase II						
	A*	B*	Bw4/6	DRB1*	DRB3*	DRB4*	DRB5*	DQA1*	DQB1*		
73	26, 30	13, 15	4, 4	0701, 1601	----	0103/11	0201/2	0102, 0201	02, 0502		
74	01, 02	40, 53	4, 6	1302, 1601	0301	----	0201/2	0102, 0501	0604, 0301		
75	11, 33	55, 58	4, 6	03011, 1501	0202	----	0101	0102, 0501	02, 0602		
76	01, 24	07, 35	6, 6	1103, 1502	0202	----	0102	0102, 0501	0301, 0502		
77	01, 02	14, 37	4, 6	1001, 1601	----	----	0201/2	01, 0102	0501, 0502		
78	01, 01	35, 35	6, 6	0101, 1101	0202	----	----	01, 0501	0501, 0301		
79	23, 23	35, 44	4, 6	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301		
80	01, 33	37, 58	4, 4	0402, 0404	----	0103/11, 0103/11	----	03, 03	0302, 0302		
81	23, 26	35, 40	6, 6	0402, 0405	----	0103/11, 0103/11	----	03, 03	02, 0302		
82	24, 26	18, 35	6, 6	1001, 1502	----	----	0102	01, 0102	0501, 0602		
83	02, 02	35, 52	4, 6	1101, 1502	0202	----	0102	0103, 0103	06012, 06012		
84	03, 30	13, 35	4, 6	0101, 0701	----	0103/11	----	0201, 0501	02, 0501		
85	01, 02	08, 51	4, 6	0402, 1104	0202	0103/11	----	03, 0501	0301, 0302		
86	02, 03	15, 41	4, 6	0402, 1401	0202	0103/11	----	01, 03	0501, 0302		
87	01, 03	35, 51	4, 6	0101, 1101	0202	----	----	01, 0501	0501, 0301		
88	29, 30	35, 51	4, 6	0802, 1101	0202	----	----	0401, 0501	0301, 0402		
89	02, 24	13, 18	4, 6	0403, 0403	----	0103/11, 0103/11	----	03, 03	0302, 0402		
90	32, 32	37, 51	4, 4	0701, 0403	----	0103/11, 0103/11	----	0201, 03	02, 0302		

**Tabla 10.** Alelos HLA de clase I y II obtenidos por técnicas de oligotipaje directo y reverso en una muestra de población cretense.

Nº	Alelos HLA clase I			Alelos HLA clase II					
	A*	B*	Bw*4/6	DRB1*	DRB3*	DRB4*	DRB5*	DQA1*	DQB1*
91	33, 33	08, 53	4, 6	0101, 1104	0202	----	----	01, 0501	0501, 0301
92	01, 23	44, 52	4, 4	0701, 1502	----	0103/11	0102	0102, 0201	02, 06011
93	24, 24	18, 55	6, 6	1302, 1101	0301, 0202	----	----	0102, 0501	0301, 0609
94	02, 02	35, 37	4, 6	0101, 12021	0202	----	----	01, 0501	0501, 0301
95	02, 02	49, 57	4, 4	0701, 1101	0202	0103/11	----	0201, 0501	0301, 03032
96	01, 01	15, 35	6, 6	0101, 03011	0202	----	----	01, 0501	02, 0501
97	28, 30	18, 51	4, 6	1501, 1101	0202	----	0101	0102, 0501	0301, 0502
98	01, 31	07, 51	4, 6	1501, 1601	----	----	0101, 0201/2	0102, 0102	0502, 0602
99	01, 23	35, 51	4, 6	0102, 1101	0202	----	----	01, 0501	0301, 0501
100	24, 24	35, 35	6, 6	0101, 1301	0101	----	----	01, 0103	0501, 0603
101	30, 30	13, 35	4, 6	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301
102	23, 29	27, 44	4, 4	0104, 1401	0202	----	----	01, 01	0501, 05031
103	02, 29	44, 44	4, 4	1001, 0403	----	0103/11	----	01, 03	0501, 0305
104	02, 24	13, 13	4, 4	1301, 1601	0101	----	0201/2	0102, 0103	0502, 0603
105	25, 25	55, 55	6, 6	12021, 1601	0202	----	0201/2	0102, 0501	0301, 0502
106	02, 02	13, 13	4, 4	1301, 1601	0101	----	0201/2	0102, 0103	0502, 0603
107	24, 24	44, 44	4, 4	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301
108	02, 02	35, 35	6, 6	0101, 1101	0202	----	----	01, 0501	0301, 0501

**Tabla 10.** Alelos HLA de clase I y II obtenidos por técnicas de oligotipaje directo y reverso en una muestra de población cretense.

Nº	Alelos HLA clase I			Alelos HLA clase II						
	A*	B*	Bw4/6	DRB1*	DRB3*	DRB4*	DRB5*	DQA1*	DQB1*	
109	02, 02	27, 35	4, 6	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301	
110	23, 01	49, 49	4, 4	1101, 1501	0202	----	0101	0102, 0501	0602, 0602	
111	26, 26	35, 53	4, 6	1301, 1302	0101, 0301	----	----	0102, 0103	0603, 0604	
112	01, 01	35, 35	6, 6	1101, 1104	0202, 0202	----	----	0102, 0501	0301, 0502	
113	11, 11	35, 35	6, 6	0101, 1101	0202	----	----	01, 0503	0301, 0501	
114	31, 33	35, 38	4, 6	0403, 1401	0202	0103/11	----	01, 03	0302, 05031	
115	23, 32	39, 40	6, 6	0701, 1104	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 0301	
116	23, 23	08, 35	6, 6	1101, 1601	0202	----	0201/2	0102, 0501	0301, 0502	
117	02, 02	39, 53	4, 6	0701, 1601	----	0103/11	0201/2	0201, 0102	02, 0502	
118	02, 02	37, 58	4, 4	03011, 0402	0202	0103/11	----	03, 0501	02, 0302	
119	02, 02	15, 51	4, 4	0402, 1301	0101	0103/11	----	0103, 03	0302, 0603	
120	02, 32	51, 51	4, 4	12021, 1601	0202	----	0201/2	0102, 0501	0301, 0502	
121	02, 02	35, 35	6, 6	1401, 1601	0202	----	0201/2	01, 0102	0502, 05031	
122	26, 30	27, 35	4, 6	0101, 1601	----	----	0201/2	01, 0102	0501, 0502	
123	24, 24	35, 35	6, 6	0402, 0701	----	0103/11, 0103/11	----	0201, 03	02, 0302	
124	02, 24	35, 35	6, 6	1101, 1601	0202	----	0201/2	0102, 0501	0301, 0502	
125	01, 01	07, 35	6, 6	0403, 1303	0101	0103/11	----	03, 0501	0301, 0302	
126	02, 02	15, 55	4, 6	1302, 1401	0301, 0202	----	----	01, 0102	05031, 06051	



**Tabla 10.** Alelos HLA de clase I y II obtenidos por técnicas de oligotipaje directo y reverso en una muestra de población cretense.

N <sup>o</sup>	Alelos HLA clase I			Alelos HLA clase II						
	A*	B*	Bw4/6	DRB1*	DRB3*	DRB4*	DRB5*	DQA1*	DQB1*	
127	03, 03	51, 53	4, 4	0101, 0701	----	0103/11	----	01, 0201	02, 0501	
128	25, 25	07, 35	6, 6	1103, 1401	0202, 0202	----	----	01, 0501	05031, 0301	
129	29, 33	35, 38	4, 6	03011, 1401	0202, 0202	----	----	01, 0501	02, 05031	
130	02, 23	15, 38	6, 4	1101, 1101	0202, 0202	----	----	0501, 0501	0301, 0304	
131	24, 25	07, 35	6, 6	0403, 1601	----	0103/11	0201/2	0102, 03	0302, 0502	
132	03, 24	37, 51	6, 4	1201, 1301	0202, 0301	----	----	0103, 0501	0301, 0603	
133	02, 24	07, 38	6, 4	03011, 0701	0202	0103/11	----	0201, 0501	02, 02	
134	01, 24	38, 38	4, 4	1104, 1301	0202, 0101	----	----	0103, 0501	02, 0603	
135	24, 24	07, 52	4, 6	0404, 1502	----	0103/11	0102	0102, 03	0302, 06012	

**Tabla 11.** Frecuencias alélicas de los loci HLA-A y -B en la población cretense.

Alelos	Frecuencias Alélicas %	Alelos	Frecuencias Alélicas %
<b>HLA-A</b>		<b>HLA-B</b>	
A1	12.0	B7	7.0
A2	25.5	B8	4.3
A3	7.5	B13	3.8
A11	4.0	B14	4.3
A23	8.0	B15	3.8
A24	15.0	B18	7.5
A25	3.0	B27	1.0
A26	6.0	B35	24.4
A29	4.0	B37	3.2
A30	4.0	B38	3.7
A31	1.0	B39	1.6
A32	3.5	B40	2.2
A33	4.5	B41	0.5
A28	0.5	B44	4.8
A68	1.5	B49	2.7
		B50	0.5
		B51	10.2
		B52	3.2
		B53	3.2
		B55	3.7
		B57	1.6
		B58	2.1

## 2.2. Frecuencias alélicas de los loci HLA de clase II

En la Tabla 12 se muestran las frecuencias alélicas de los loci HLA de clase II (HLA-DRB1, -DQA1 y -DQB1) obtenidos en el presente trabajo. Los alelos de estos loci se caracterizaron mediante oligotipaje directo (DQA1) y reverso (DRB1 y DQB1), siendo capaces de reconocer la mayoría de los alelos descritos: DQA1= 8 alelos, DRB1= 155 alelos y DQB1= 27 alelos. Estos datos se compararon con los de otras poblaciones previamente estudiadas (*Imanishi y col. 1992b; Clayton y Lonjou 1997; y poblaciones de la Tabla 13*).

### Locus DRB1

DR1. En la muestra de población estudiada aparecieron los subtipos DRB1\*0101 (6.6%), \*0102 (1.4%) y \*0104 (0.4%). DRB1\*0102 es mayoritario en poblaciones africanas y en sardos, mientras que el alelo mayoritario en las poblaciones caucasoides es \*0101. El subtipo DRB1\*0104 se ha detectado en húngaros (5.7%) y es de suponer que pueda estar presente en otros europeos (*Clayton y Lonjou 1997*).

DR2. En el estudio realizado han aparecido las variantes DRB1\*1601 (7.8%), \*1502 (4.4%) y

\*1501 (3.7%). Existen poblaciones aisladas como las de Senegal y los sardos cuyo alelo mayoritario es \*1601. El alelo \*1501 es el principal en poblaciones caucasoides, africanas y orientales, excepto japoneses. DRB1\*1502 se encuentra con muy baja frecuencia en poblaciones africanas; mayor es su frecuencia en mediterráneos como españoles e italianos (2%) y rumanos (4.7%). Los hindúes y japoneses son los que presentan la mayor frecuencia de este alelo.

DR3. Se ha encontrado únicamente el subtipo DRB1\*03011 (7.4%) en la población cretense. Este alelo se encuentra en elevada frecuencia en poblaciones negroides, excepto en los bosquimanos (1.9%). Los europeos también muestran una frecuencia alta, especialmente los sardos (24.5%). Por otra parte, se encuentra en muy baja frecuencia en japoneses y relativamente elevada en chinos de Singapur (5.7%). Este alelo forma parte de dos haplotipos extendidos: A1-B8-DR3 frecuente en europeos occidentales y norteeuropeos, y el haplotipo A30-B18-DR3 frecuente en íberos, norteafricanos y sardos.

DR4. En la muestra de población cretense analizada se han encontrado los subtipos \*0401 (0.7%), \*0402 (5.1%), \*0403 (3.3%), \*0404 (1.1%), y \*0405 (1.9%). La frecuencia mayoritaria del alelo DRB1\*0401 se observa en poblaciones caucasoides no mediterráneas, y con baja en frecuencia en libaneses, africanos sub-saharianos, europeos orientales, y mediterráneos (españoles, italianos y griegos). Su máxima frecuencia se observa en el aislado de los bosquimanos (San). DRB1\*0402 es mayoritario en norteafricanos (argelinos-8%, y marroquíes-4.6%) y judíos (15%). También está presente en caucasoides mediterráneos como los españoles (2.9%), italianos (1.4%), y sardos (1.1%). DRB1\*0403 tiene una distribución similar a DRB1\*0402, salvo su presencia en orientales (4% en japoneses); es mayoritario en caucasoides mediterráneos, norteafricanos (bereberes y marroquíes) y libaneses. La mayor frecuencia del alelo DRB1\*0404 se observa en los hotentotes (también los bosquimanos) e hindúes, pero con escasa frecuencia en el resto de poblaciones africanas y orientales. Es de frecuencia variable en europeos con un máximo en los españoles (2.4%). DRB1\*0405 es característico de poblaciones mediterráneas y orientales, así como de la población argelina y marroquí. En las poblaciones mediterráneas forma preferentemente el haplotipo DRB1\*0405-DQB1\*0302, mientras en las orientales el haplotipo mayoritario es DRB1\*0405-DQB1\*0402 (*Imanishi y col. 1992b; Arnáiz-Villena y col. 1995; Martínez-Laso y col. 1995*).

DR11. Los subtipos encontrados y sus frecuencias son: \*1101 (11.1%), \*1102 (0.4%), \*1103 (2.2%) y \*1104 (10%). DRB1\*1101 es mayoritario en poblaciones africanas, caucasoides y orientales. El alelo DRB1\*1104 es mayoritario en mediterráneos como españoles, italianos y sardos, y también en rumanos. DRB1\*1103 es poco frecuente, pero aparece con frecuencias entre 1-2% en algunas poblaciones aisladas como alemanes, italianos, gitanos españoles e hindúes. Finalmente, DRB1\*1102 es característico de algunas poblaciones africanas (*Imanishi y col. 1992b*).

DR12. Los cretenses presentan los alelos \*1201 (0.7%) y \*12021 (1.9%). El primero aparece elevado en algunas poblaciones negroides norteafricanas y sudafricanas; de frecuencia baja en asiáticos y aún más en europeos. DRB1\*12021 también se encuentra en negroides africanos pero en una frecuencia baja, mucho menor que el anterior alelo. Los europeos carecen prácticamente de este alelo, mientras los hindúes y

japoneses lo portan en un 2%. Sólo los Buyi (China) y los chinos de Singapur presentan una elevada frecuencia ( $\cong 8.5\%$ ) de este alelo.

DR13. De este grupo se han detectado los subtipos DRB1\*1301 (3.3%), \*1302 (3.7%), \*1303 (1.1%) y \*1305 (0.4%). El primer alelo es mayoritario en caucasoides. DRB1\*1302 es característico de poblaciones africanas y con similar frecuencia en orientales. También aparece, con menor frecuencia, en daneses y centroeuropeos (3.4% en alemanes) y europeos orientales (1.4% en rumanos). Los españoles e italianos presentan una frecuencia similar de este alelo a la encontrada en cretenses. DRB1\*1303 aparece en baja frecuencia en todas las poblaciones en general. Por último, DRB1\*1305 aparece en muy baja frecuencia y en poblaciones aisladas de Asia, del África sub-sahariana, y de Europa del Este; presenta su mayor frecuencia en la isla Croata de KrK (2.4%).

DR14. De los subtipos alélicos definidos para esta especificidad sólo aparece en cretenses el alelo \*1401 (4.4%). Los centroafricanos y sudafricanos presentan una frecuencia menor que la mitad, y en los europeos nórdicos es aún menor, mientras que los europeos mediterráneos presentan la mayor frecuencia (5.1% en italianos). Por otra parte, los orientales también portan este alelo (3.8% en japoneses).

DR7. DRB1\*0701 se encuentra muy elevado en la mayoría de las poblaciones negroides africanas y mediterráneas norteafricanas, europeas mediterráneas, centroeuropeas y asiáticas, en las que contrasta una baja frecuencia en japoneses y elevada en coreanos.

DR8. Las variantes alélicas encontradas en cretenses son \*0802 (0.7%), \*0803 (0.3%). El primero aparece en negroides con una relativa alta frecuencia (5.0% en Senegal y 3.9% en San), en muy baja frecuencia en algunos europeos (0.6% en alemanes y 0.2% en italianos), y también en baja frecuencia en asiáticos, excepto en japoneses (3.8%). Por el contrario, DRB1\*0803 aparece con muy baja frecuencia en negroides, y también en europeos. Los japoneses y coreanos tienen elevada frecuencia de este último alelo.

DR9. No se han detectado ninguno de los alelos descritos en la muestra de población estudiada. Existe en poblaciones negroides un gradiente desde 0% hasta 1.7%. Su frecuencia es nula en nórdicos (daneses), italianos y sardos. Además, es muy baja en centroeuropeos (alemanes y rumanos) y elevada en orientales (13.7% en japoneses y 9% en coreanos)

DR10. Sólo existe un subtipo alélico (DRB1\*1001) y aparece en cretenses con una frecuencia de 3.7%. Este se encuentra con su mayor frecuencia en paquistaníes (8.4%), poblaciones asiáticas (4.7% en chino-tailandeses), mediterráneos (5.3% en griegos), y norteafricanos (4.9% en beduinos).

### **Locus DRB3**

Se encuentra en el mismo haplotipo que DRB1 cuando éste codifica para alelos de los grupos DR3, DR11, DR12, DR13 y DR14. Por tanto, la frecuencia de los alelos del locus DRB3 es dependiente de la frecuencia de los alelos de DRB1 mencionados. DRB3 es poco polimórfico respecto a DRB1, y no se han encontrado alelos de este locus diferentes a los descritos en otras poblaciones (*Imanishi y col. 1992b*;

Clayton y Lonjou 1997, y referencias de la Tabla 13).

**Tabla 12.** Frecuencias alélicas de los loci HLA-DRB1, -DQA1 y -DQB1 en la población cretense.

Alelos	Frecuencias Alélicas %	Alelos	Frecuencias Alélicas %
<b>HLA-DRB1</b>		<b>HLA-DQA1</b>	
0101	6.6	01	16.6
0102	1.4	0102	17.8
0104	0.4	0103	5.2
0301	7.4	0201	12.6
0401	0.7	03	12.2
0402	5.1	0401	1.1
0403	3.3	0501	34.7
0404	1.1	0503	0.4
0405	1.9	<b>HLA-DQB1</b>	
0701	11.1	02	20.0
0802	0.7	0301	27.1
0803	0.3	0302	9.2
1001	3.7	03032	0.8
1101	11.1	0304	0.4
1102	0.4	0305	0.4
1103	2.2	0401	0.4
1104	10.0	0402	0.8
1201	0.7	0501	13.0
12021	1.9	0502	10.0
1301	3.3	05031	4.5
1302	3.7	06011	1.9
1303	1.1	06012	1.1
1305	0.4	0602	3.7
1401	4.4	0603	3.3
1501	3.7	0604	3.0
1502	4.4	0606/9	0.4
1601	7.8	06051	0.4

Los alelos DQA1\*0101 y 0104 fueron asignados como DQA1\*01. Los alelos DQA1\*03011 y 0302 fueron asignados como DQA1\*03. Los alelos DQA1\*05011, 05012 y 05013 fueron asignados como DQA1\*0501. Los alelos DQB1\*0201 y 0202 fueron asignados como DQB1\*02.

#### **Locus DRB4**

Presenta un polimorfismo restringido y se encuentra en el mismo haplotipo que DRB1 cuando éste codifica para alelos de los grupos DR4, DR7 y DR9. No se han encontrado alelos de este locus diferentes a los descritos en otras poblaciones (*Imanishi y col. 1992b; Clayton y Lonjou 1997, y referencias de la Tabla 13*).

#### **Locus DRB5**

Este locus es también poco polimórfico y se encuentra en el mismo haplotipo que DRB1 cuando éste codifica para los alelos del grupo DR2, que se divide en las variantes DR15 y DR16. Tampoco se han encontrado alelos de este locus diferentes a los descritos en otras poblaciones (*Imanishi y col. 1992b; Clayton y Lonjou 1997, y referencias de la Tabla 13*).

#### **Locus DQA1/ Locus DQB1**

El polimorfismo de estos loci es menor que el de DRB1 y no se han detectado variantes alélicas diferentes a las descritas previamente. Los alelos de mayor frecuencia para el locus DQA1 son DQA1\*0501 (34.7%), \*0102 (17.8%), \*01 (16.6%), \*0201 (12.6%), y \*03 (12.2%), mientras que para el locus DQB1 son DQB1\*0301 (27.0%), \*02 (20.0%), \*0501 (12.9%), \*0502 (10.0%) y \*0302 (9.2%).

Las frecuencias de los alelos de los loci DQA1 y DQB1 dependen de las frecuencias de alelos de DRB1, ya que los tres loci forman haplotipos característicos. Así, la elevada frecuencia de DQA1\*0501 se debe a que este va en desequilibrio de ligamiento con DQB1\*02 ó \*0301, y ambas combinaciones van acompañadas respectivamente de DR3 o DR11, que poseen elevada frecuencia en la población cretense.

### **3. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS**

#### **3.1. Distancias genéticas, dendrogramas y análisis de correspondencia**

Las distancias genéticas se calcularon por el método de Nei (1972) mediante la comparación de frecuencias HLA en la población cretense y otras poblaciones (Tabla 13 y Figura 32). La construcción de dendrogramas o árboles filogenéticos se realizó por el método de neighbor-joining (NJ) a partir de las distancias genéticas calculadas (*Saitou y Nei 1987*). Los análisis de correspondencia se obtuvieron a partir de las distancias genéticas, y proporcionan una idea global de las relaciones filogenéticas entre las poblaciones comparadas (ver apdos. 7.3 y 7.4 de Material y Métodos). Estos análisis se llevaron a cabo con tres conjuntos de datos:

**Tabla 13.** Poblaciones comparadas en el presente trabajo.

<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>Referencia</b>
Cretenses	135	Presente trabajo
Marroquíes (El Jadida) <sup>@</sup>	98	Gómez-Casado y col. 2000
Bereberes (Agadir, Marruecos) <sup>#</sup>	98	Izaabel y col. 1998
Judíos (Marruecos)	94	Roitberg-Tambur y col. 1995
Espanoles (Madrid)	176	Martínez-Laso y col. 1995
Vascos (San Sebastián)	80	Martínez-Laso y col. 1995
Portugueses (Coimbra)	236	Arnaiz-Villena y col. 1997
Franceses	179	Imanishi y col. 1992b
Argelinos (Argel)	102	Arnaiz-Villena y col. 1995
Sardos	91	Imanishi y col. 1992b
Italianos	284	Imanishi y col. 1992b
Judíos (Ashkenazi)	80	Martínez-Laso y col. 1996
Judíos (no Ashkenazi)	80	Martínez-Laso y col. 1996
Macedonios (Skopje)	172	Arnaiz-Villena y col. 2001a
Griegos (islas del Egeo)	85	Clayton y Lonjou 1997
Griegos (Ática)	96	Clayton y Lonjou 1997
Griegos (Chipre)	101	Clayton y Lonjou 1997
Libaneses (NS) <sup>1</sup>	59	Clayton y Lonjou 1997
Libaneses (KZ) <sup>2</sup>	93	Clayton y Lonjou 1997
Iraníes	100	Mehra y col. 1997
Turcos (Estambul)	228	Arnaiz-Villena y col. 2001b
Armenios	105	Imanishi y col. 1992b
Egipcios (oasis de Siwa)	101	Clayton y Lonjou 1997
Oromo (Etiopía)	83	Clayton y Lonjou 1997
Amhara (Etiopía)	98	Clayton y Lonjou 1997
Fulani (Burkina Faso)	38	Clayton y Lonjou 1997
Rimaibe (Burkina Faso)	39	Clayton y Lonjou 1997
Mossi (Burkina Faso)	42	Clayton y Lonjou 1997
Bosquimanos (San)	77	Imanishi y col. 1992b
Senegaleses	192	Imanishi y col. 1992b
Negroides sudafricanos	86	Imanishi y col. 1992b

N= número de individuos analizados en cada población. <sup>@</sup> lengua árabe. <sup>#</sup> lengua bereber (Marruecos).

<sup>1</sup>NS= Niha el Shouff (ciudad) <sup>2</sup>KZ= Kafar Zubian (ciudad).



**Figura 32.** Localización geográfica de las poblaciones utilizadas en las comparaciones genéticas.



### 3.1.1. Loci HLA-A, -B y -DRB1

Con el conjunto de datos de las frecuencias alélicas de HLA-A y -B (baja resolución) y HLA-DRB1 (alta resolución), se calcularon las distancias genéticas de los cretenses respecto a las poblaciones que aparecen en la Tabla 14.

Este análisis no se pudo realizar con poblaciones que, hasta el momento, carecen de datos de frecuencias HLA-A y -B. Estas poblaciones corresponden a los bereberes (de Souss, área de Agadir, Marruecos), judíos (Ashkenazi), judíos (Marruecos), judíos (no Ashkenazi) y libaneses (NS y KZ) entre otras (ver Tabla 13 y Figura 32). Tampoco se pudo incluir en el análisis el locus DQB1 porque no se disponía de los tipajes por alta resolución de los griegos (Ática, Chipre y Egeo) (ver Tabla 13 y Figura 32).

El dendrograma construido mediante el método de neighbor-joining (Figura 33) basado en las distancias genéticas calculadas, muestra cómo los mediterráneos occidentales europeos y norteafricanos (italianos, españoles, vascos, argelinos, sardos) están cercanos entre sí. Los griegos (Chipre, Ática, Egeo) derivan de una rama común y aunque los japoneses se encuentran agrupados con los griegos, la longitud de sus ramas indican una distancia genética elevada entre ellos, y parecen comportarse en realidad como grupos divergentes al igual que los bosquimanos (San). Aunque los cretenses y argelinos agrupan juntos, la longitud de la rama de los cretenses es mucho mayor lo que indica una distancia genética elevada.

Para este dendrograma, los argelinos presentan la menor distancia genética ( $38.21 \times 10^{-2}$ ) respecto a los cretenses (Tabla 14). Con una discontinuidad en la distancia genética sigue el par cretenses-marroquíes (El Jadida) ( $51.13 \times 10^{-2}$ ), y con una distancia muy similar los griegos de Ática ( $51.20 \times 10^{-2}$ ) y los macedonios ( $52.78 \times 10^{-2}$ ). Los griegos de Chipre ( $75.68 \times 10^{-2}$ ) y los de Ática-Egeo ( $96.70 \times 10^{-2}$ ) se encuentran muy alejados de los cretenses.

El análisis de correspondencia obtenido (Figura 34) muestra la representación geométrica de las dos dimensiones con mayores porcentajes de inercia, parámetro similar a la varianza, respecto a la matriz de distancias genéticas de las poblaciones comparadas. Por tanto, la dimensión 1 y la dimensión 2 son las más representativas y contribuyen con un 36.88% y un 30.14% respectivamente. La correspondencia ofrece una distribución de las poblaciones más intuitiva y clara que el dendrograma y las distancias genéticas. Podemos observar la siguiente distribución de poblaciones: 1) los cretenses y los macedonios junto a otros mediterráneos europeos y norteafricanos, 2) las tres poblaciones griegas forman un grupo homogéneo, pero sorprendentemente se encuentran muy separadas de los cretenses, macedonios y otras poblaciones mediterráneas, 3) los japoneses y bosquimanos (San) ,

### 3.1.2. Locus HLA-DRB1

La Tabla 15 recoge las distancias genéticas obtenidas a partir de las frecuencias de DRB1 (alta resolución) pertenecientes a todas las poblaciones que aparecen en la Tabla 13, excepto aquellas que no pudieron incluirse en los cálculos ya que no tienen caracterizados los alelos de DRB1 por alta resolución:

portugueses, turcos, iraníes, y egipcios. El dendrograma neighbor-joining construido con este conjunto de datos (Figura 35) nos ofrece una distribución filogenética más específica y completa que el anterior (Figura 33). Los íberos (españoles y vascos) y norteafricanos (argelinos de Argel, marroquíes y bereberes de Marruecos) se agrupan en torno a una rama común. Por otra parte, se observa otro grupo formado por los cretenses, sardos, macedonios, italianos y judíos Ashkenazi. Este grupo y el formado por los libaneses y judíos (no Ashkenazi, Marruecos) convergen en una rama común. Los griegos (chipriotas y de Ática) se encuentran dentro de este último grupo, aunque con una longitud de rama mucho mayor, es decir, más alejados genéticamente. En definitiva, los mediterráneos occidentales y orientales forman respectivos grupos que están inter-relacionados (Figura 35).

El estudio de las distancias genéticas para DRB1 (Tabla 15) refleja que los judíos (no Ashkenazi), macedonios, judíos (Ashkenazi) y judíos (Marruecos) son los más cercanos a los cretenses. En general, los cretenses están más cercanos a todos los mediterráneos del Este y Oeste (europeos y africanos) que a los griegos. De hecho, después de la distancia genética entre cretenses y vascos ( $32 \times 10^{-2}$ ), se observa una discontinuidad con el siguiente valor más próximo ( $72 \times 10^{-2}$ ) que corresponde a la distancia genética entre cretenses y griegos de Ática.

El análisis de correspondencia obtenido con las distancias genéticas de las poblaciones comparadas (Figura 36) muestra las dos dimensiones con mayor peso; la dimensión 1 aporta el 43.15% de la inercia y la dimensión 2 contribuye con el 63.53% acumulado. En esta correspondencia se pueden diferenciar los siguientes conjuntos poblacionales: 1) los japoneses y bosquimanos; 2) los mediterráneos occidentales (españoles, vascos, argelinos, bereberes, sardos, italianos, etc); 3) los mediterráneos orientales, que incluyen a los cretenses junto con los macedonios, judíos (Ashkenazi, no Ashkenazi, Marruecos), y libaneses (NS y KZ); y 4) los griegos (Ática y Chipre) que aparecen tan diferenciados del resto de mediterráneos como los japoneses y bosquimanos.

El hecho de que en los análisis realizados los griegos se muestren como grupos divergentes, no relacionados con cretenses, macedonios ni con otros mediterráneos occidentales y orientales resultó sorprendente. Más sorprendente aún fue el observar entre los resultados del 12º Taller Internacional de Histocompatibilidad, que los griegos tienen alelos HLA-DRB1 casi-específicos compartidos sólo con poblaciones de Etiopía y África occidental (Burkina Faso). Se realizaron nuevos análisis incluyendo a estas poblaciones sub-saharianas de Etiopía (Oromo y Amhara) y Burkina Faso (Mossi, Fulani, Rimaibe), así como otras poblaciones negroides de Senegal y Sudáfrica. El dendrograma construido (Figura 37) con las distancias genéticas entre las poblaciones comparadas muestra una distribución similar al anterior de los mediterráneos: los cretenses y macedonios agrupan con otros mediterráneos orientales y los mediterráneos occidentales por su parte se mantienen agrupados. Sin embargo, los tres grupos griegos se entremezclan ahora con las poblaciones sub-saharianas, pero no con otras poblaciones africanas como son los senegaleses, negroides sudafricanos y bosquimanos. Las distancias genéticas de los cretenses a estas poblaciones (Tabla 16) muestra que los griegos están tan alejados de los cretenses como los sub-

saharianos, mientras que los macedonios y judíos son los más cercanos a los cretenses.

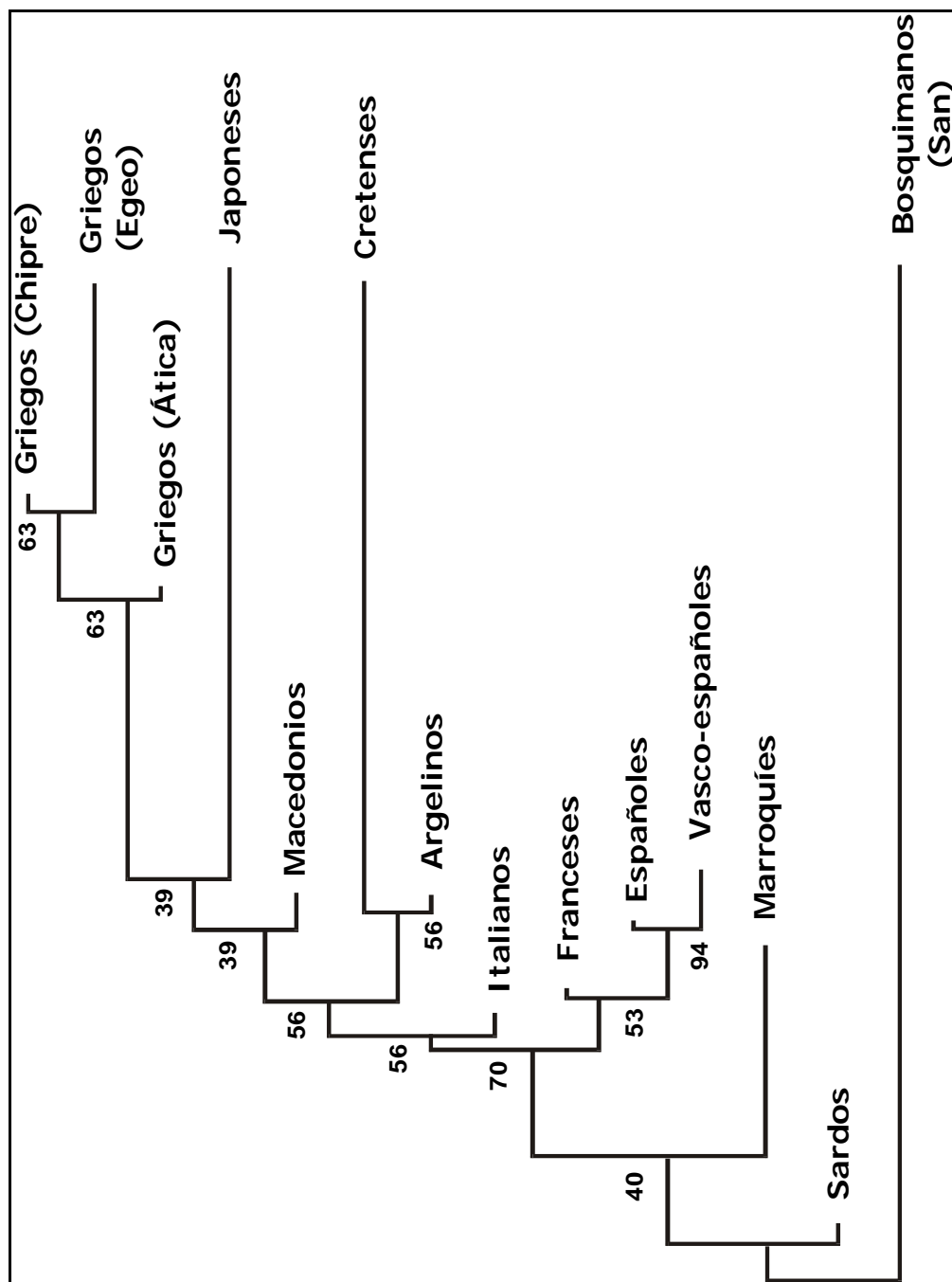
El análisis de correspondencia (Figura 38) muestra de forma clara: 1) un grupo formado por las poblaciones griegas y las sub-saharianas; 2) otro grupo formado por los senegaleses, bosquimanos y negroides sudafricanos; y 3) el conjunto de mediterráneos occidentales y orientales, siendo los cretenses y macedonios más próximos a estos.

### **3.1.3. Loci HLA-DRB1 y -DQB1**

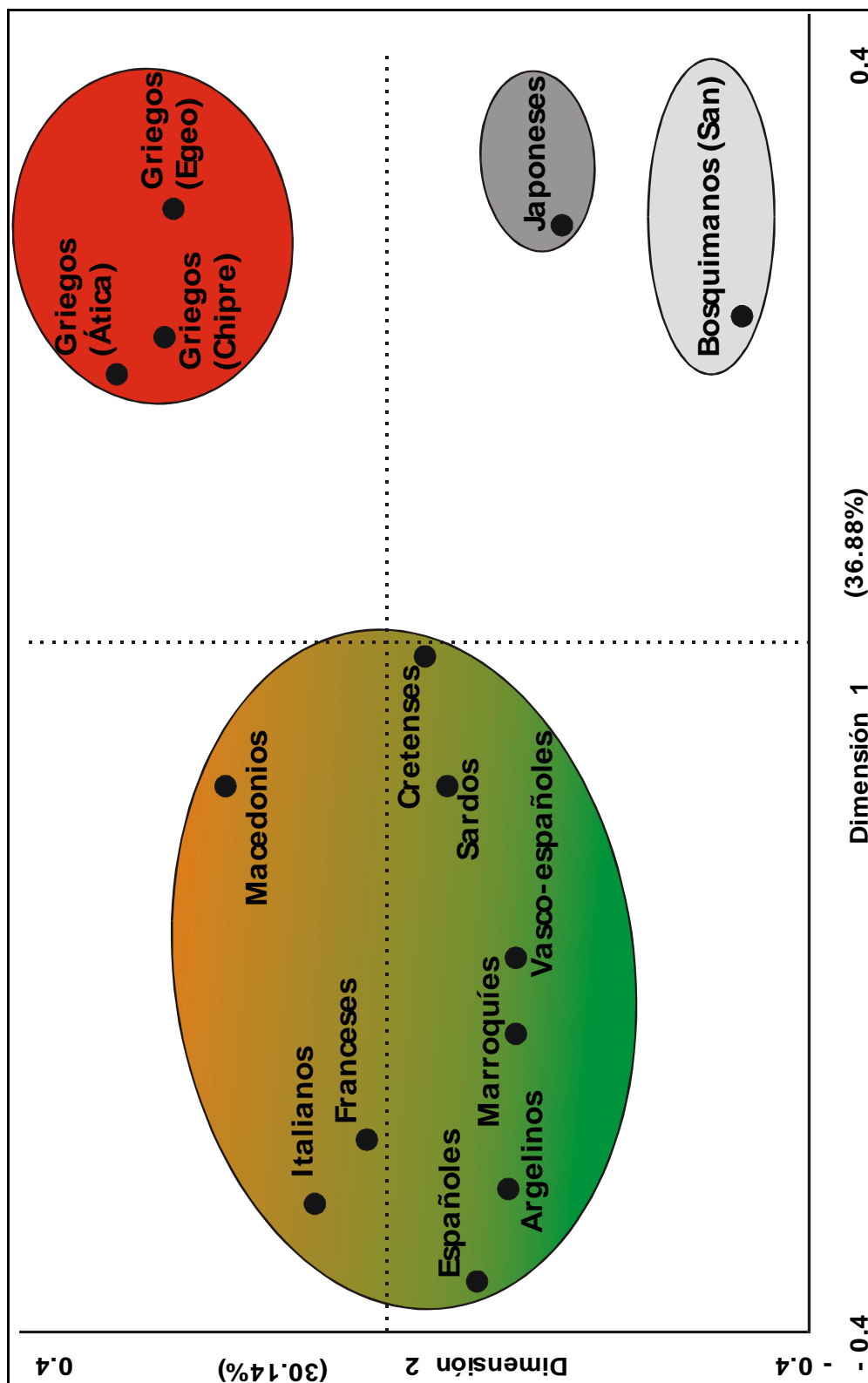
Estos análisis se llevaron a cabo con el fin de comparar los portugueses, turcos, iraníes, armenios y egipcios con los cretenses, macedonios y el resto de poblaciones analizadas anteriormente. Las distancias genéticas (Tabla 17) se calcularon a partir de las frecuencias alélicas HLA-DRB1 y -DQB1 (baja resolución).

El dendrograma neighbor-joining (Figura 39) construido a partir de las distancias genéticas muestra que, en general, se mantiene el grupo de mediterráneos occidentales (incluidos los portugueses) y orientales (incluidos los iraníes, turcos y armenios). La distancia genética menor se observa respecto a los macedonios, seguidos de iraníes y armenios. Posteriormente, se entremezclan los mediterráneos orientales y occidentales. Esto puede ser debido a que los datos DRB1 y DQB1 de baja resolución conducen a una cierta homogeneización frente a los datos DRB1 de alta resolución. Los griegos (Ática) junto con los sub-saharianos, bosquimanos y japoneses son los más alejados de los cretenses.

En el análisis de correspondencia (Figura 40) se puede observar: 1) los mediterráneos occidentales (europeos y norteafricanos) y orientales se agrupan respectivamente; 2) los griegos (Ática) se sitúan junto a los africanos occidentales (Fulani, Rimaibe, Mossi), mientras los etíopes (Oromo, Amhara) se desplazan de este último grupo. La conversión de alelos específicos de DRB1 (alta resolución) a alelos genéricos DRB1 (baja resolución) explicaría este hecho. Por otra parte, el hecho de incluir a los bosquimanos (San) como grupo divergente de los mediterráneos permite excluir de esta representación otros grupos divergentes (senegaleses y japoneses), ya que habrían homogeneizado a los grupos de poblaciones mediterráneas.



**Figura 33.** Dendrograma neighbor-joining que muestra las relaciones filogenéticas entre cretenses y otras poblaciones. Las distancias genéticas entre las poblaciones se calcularon con los datos de genotipaje de HLA-A y -B (baja resolución) y DRB1 (alta resolución). Los valores de bootstrap mostrados son de 1000 repeticiones.



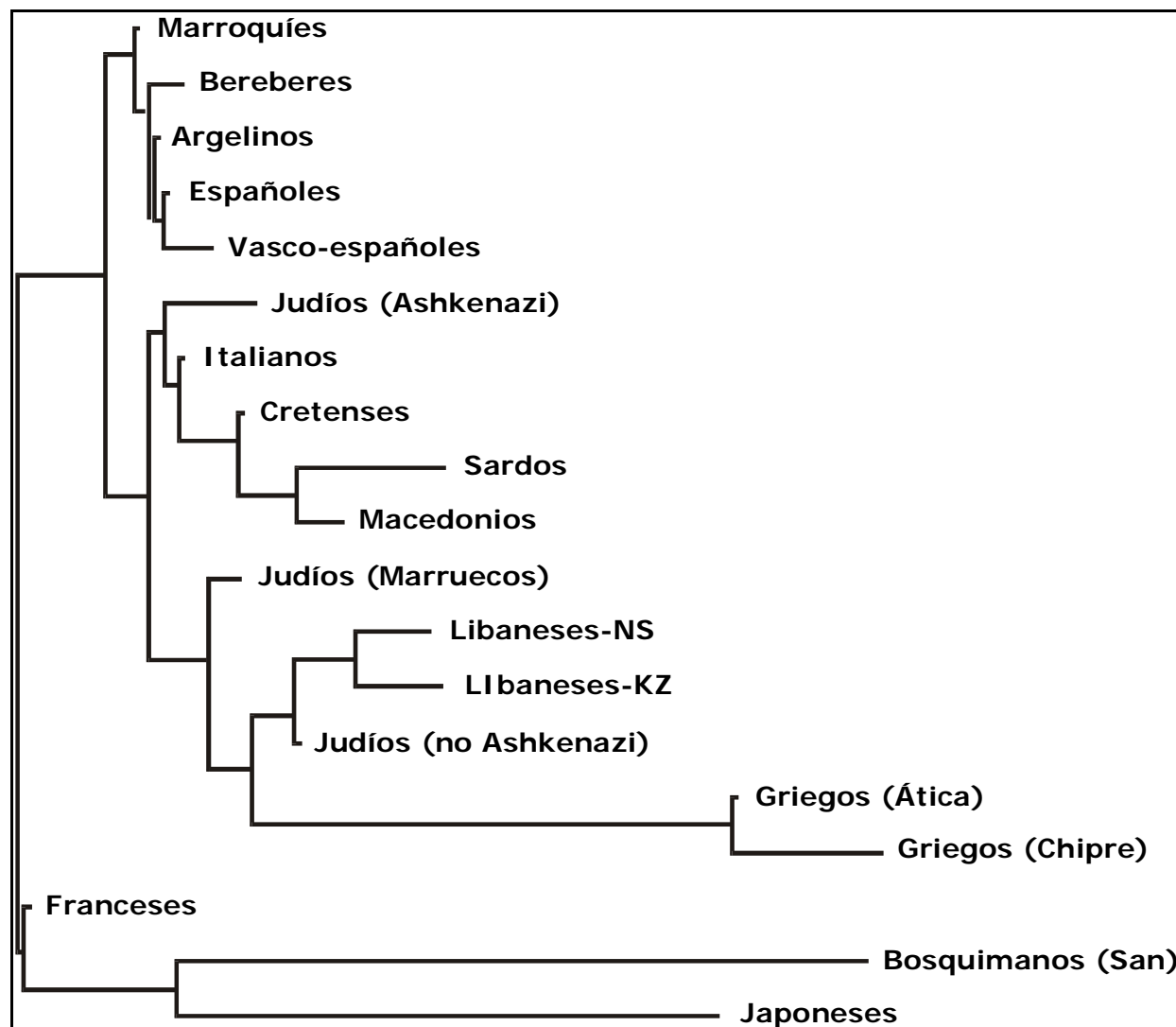
**Figura 34.** Análisis de correspondencia que muestra una visión global de las relaciones filogenéticas entre los cretenses y otras poblaciones, de acuerdo a las distancias genéticas entre las poblaciones calculadas con las frecuencias alélicas de HLA-A y -B (baja resolución) y -DRB1 (alta resolución).

**Tabla 14.** Distancias genéticas y sus errores estándar entre la población cretense y otras poblaciones ( $\times 10^{-2}$ ) calculadas a partir de las frecuencias alélicas de los loci HLA-A y B (baja resolución), y -DRB1 (alta resolución) (ver Tabla 13 para la identificación de cada población).

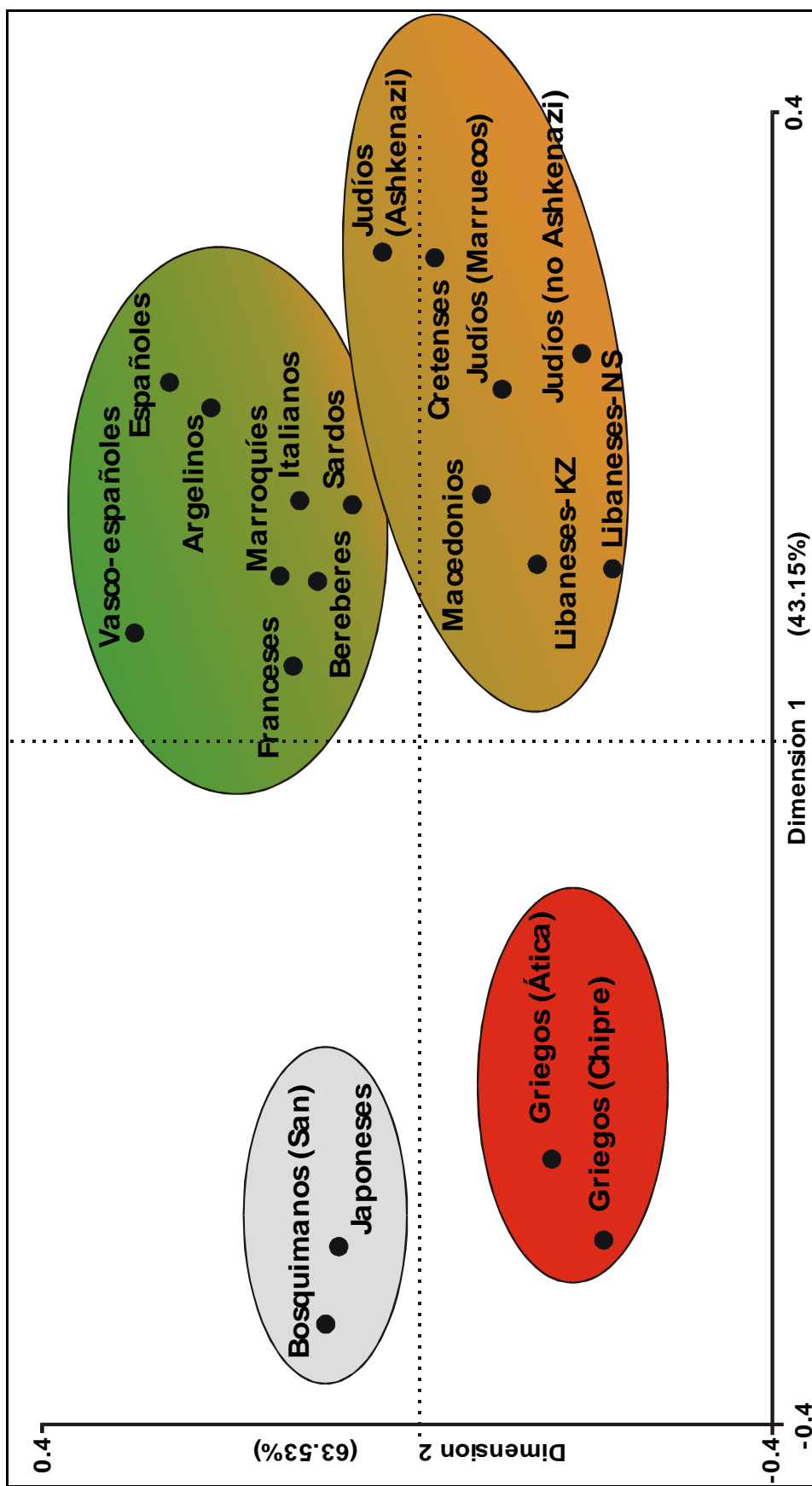
De cretenses a:	HLA-A, -B, -DRB1	
	Distancia Genética	Error estándar ( $\pm$ )
Argelinos	38.21	18.12
Marroquíes	51.13	18.40
Griegos (Ática)	51.20	14.06
Macedonios	52.78	21.36
Italianos	53.14	23.69
Vascos	60.29	18.63
Franceses	61.26	25.80
Espanoles	64.52	24.50
Sardos	72.69	25.17
Griegos (Chipre)	75.68	27.06
Japoneses	93.06	27.72
Griegos (Egeo)	96.70	38.24
Bosquimanos (San)	144.51	34.07

**Tabla 15.** Distancias genéticas entre la población cretense y otras poblaciones ( $\times 10^{-2}$ ) calculadas a partir de las frecuencias alélicas del locus HLA-DRB1 (alta resolución) El error estándar fue nulo para cada comparación (ver Tabla 13 para la identificación de cada población).

De cretenses a:	HLA-DRB1	De cretenses a:	HLA-DRB1
Judíos (no	3.75	Marroquíes	22.46
Macedonios	5.30	Libaneses (KZ)	23.26
Judíos (Ashkenazi)	7.36	Sardos	23.53
Judíos (Marruecos)	8.16	Bereberes	24.01
Italianos	10.01	Vascos	32.31
Franceses	10.99	Griegos (Ática)	72.85
Argelinos	13.43	Japoneses	101.65
Libaneses (NS)	17.11	Griegos (Chipre)	113.12
Espanoles	19.56	Bosquimanos (San)	148.13

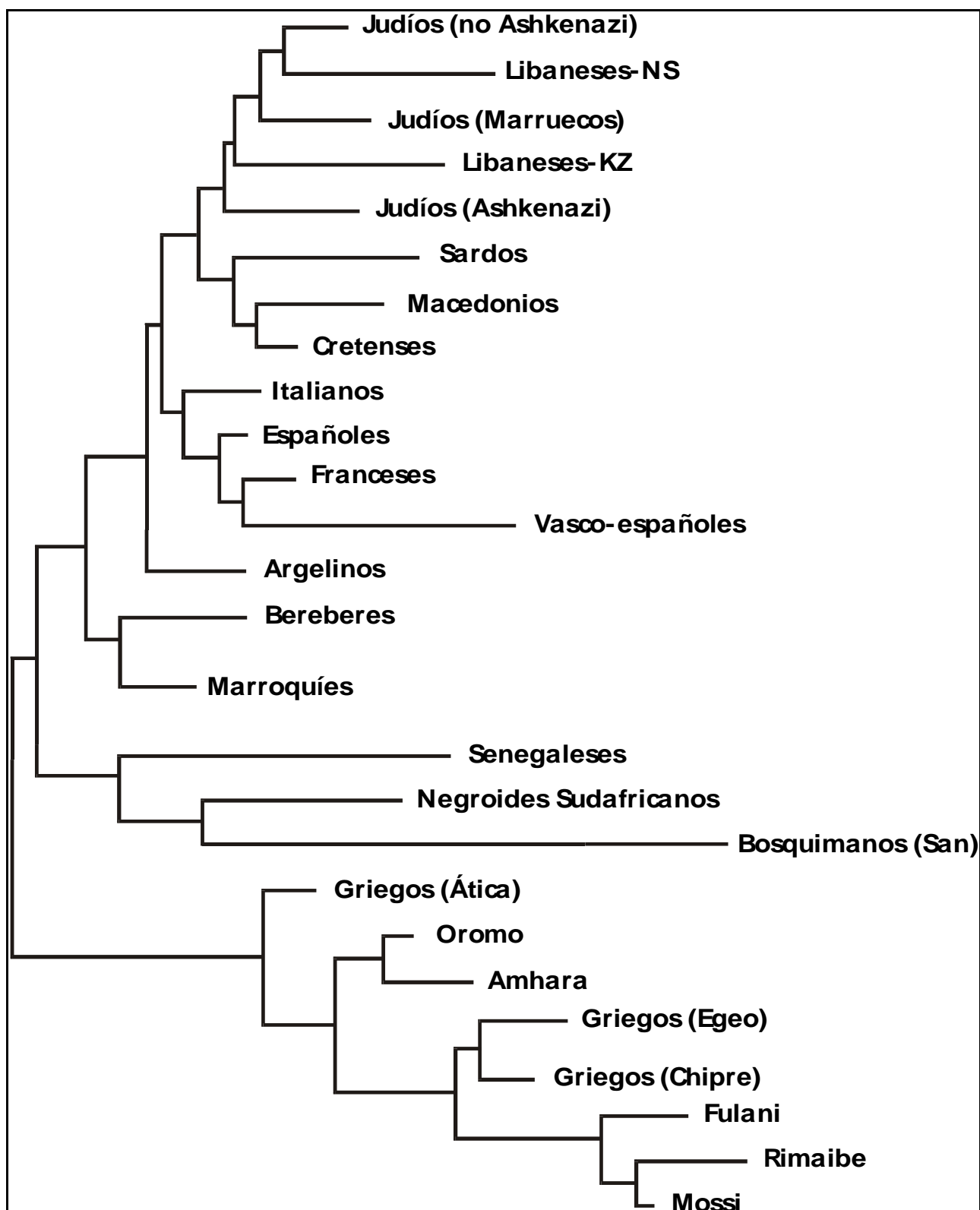


**Figura 35.** Dendrograma neighbor-joining que muestra las relaciones filogenéticas entre cretenses y otras poblaciones. Las distancias genéticas entre las poblaciones se calcularon con los datos de genotipaje de HLA-DRB1 (alta resolución). Los valores de bootstrap de 1000 replicaciones fueron 100 en todos los casos.

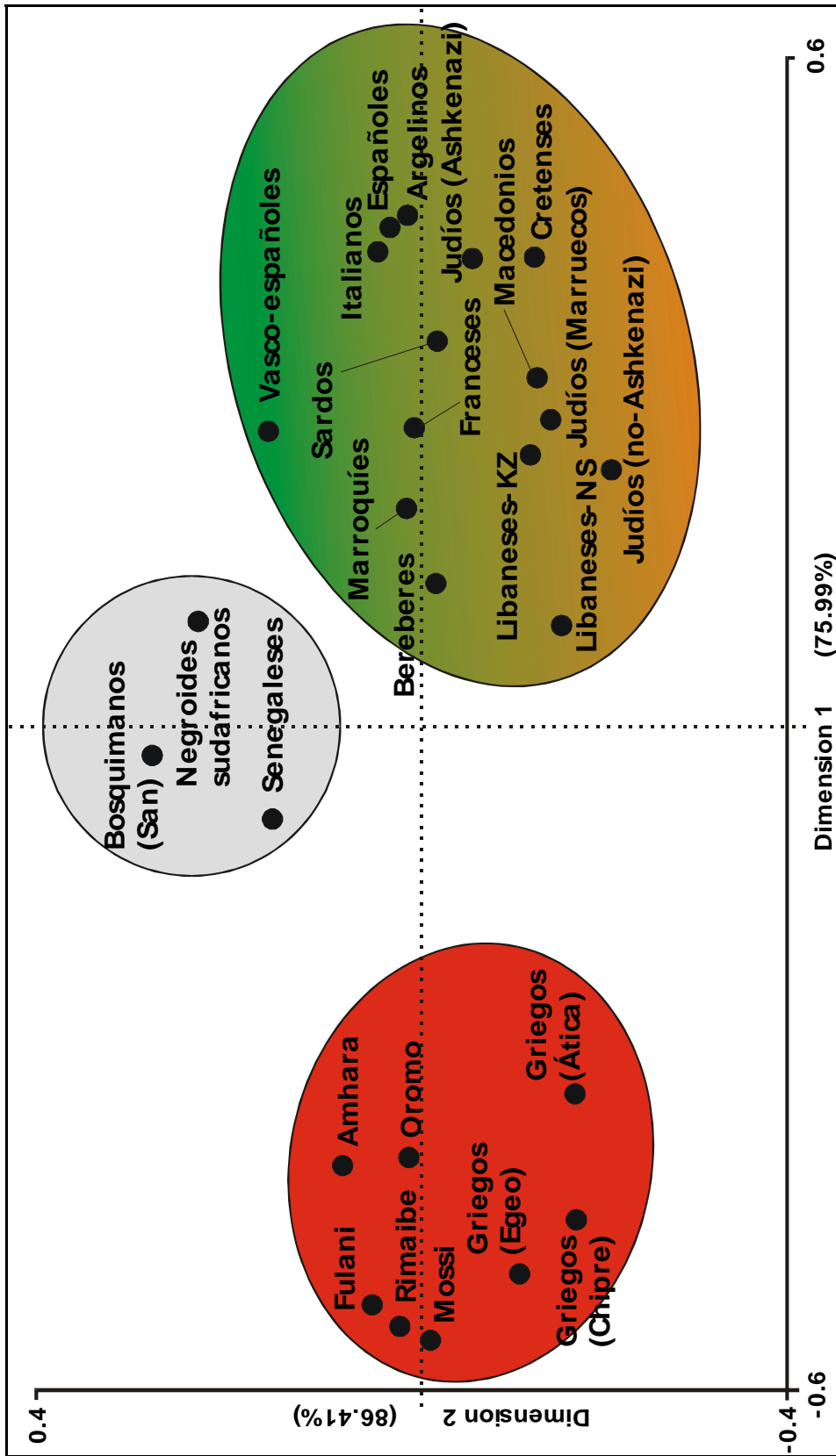


**Figura 36.** Análisis de correspondencia que muestra una visión global de las relaciones filogenéticas entre los cretenses y otras poblaciones, de acuerdo a las distancias genéticas entre las poblaciones calculadas con las frecuencias alélicas de HLA-DRB1 (alta resolución).

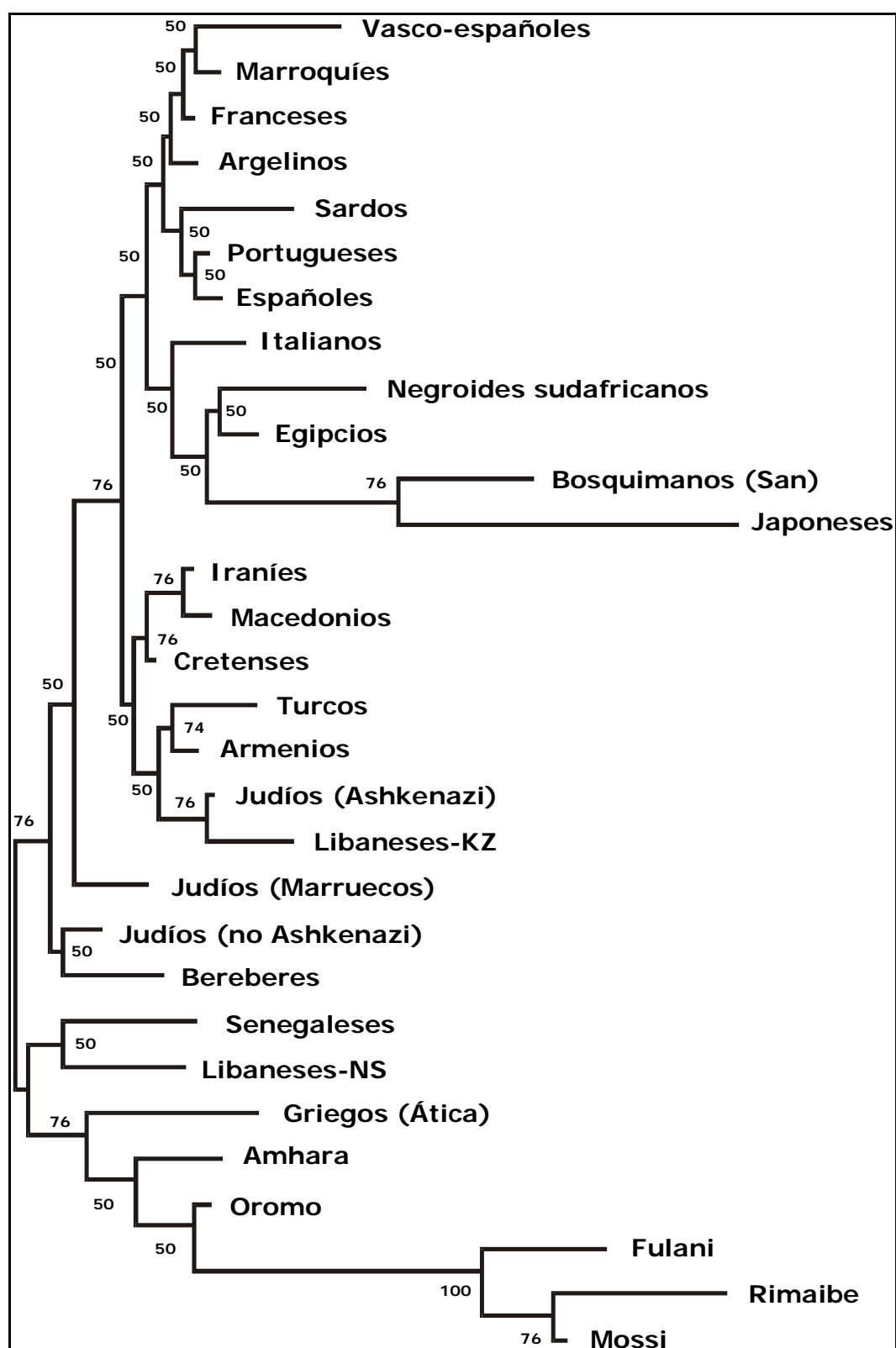




**Figura 37.** Dendrograma neighbor-joining que muestra las relaciones filogenéticas entre cretenses y otras poblaciones. Las distancias genéticas entre las poblaciones se calcularon con los datos de genotipaje de HLA-DRB1 (alta resolución). Los valores de bootstrap de 1000 replicaciones fueron 100 para todos los casos.



**Figura 38.** Análisis de correspondencia que muestra una visión global de las relaciones filogenéticas entre los cretenses y otras poblaciones, de acuerdo a las distancias genéticas entre las poblaciones calculadas con las frecuencias alélicas de HLA-DRB1 (alta resolución).



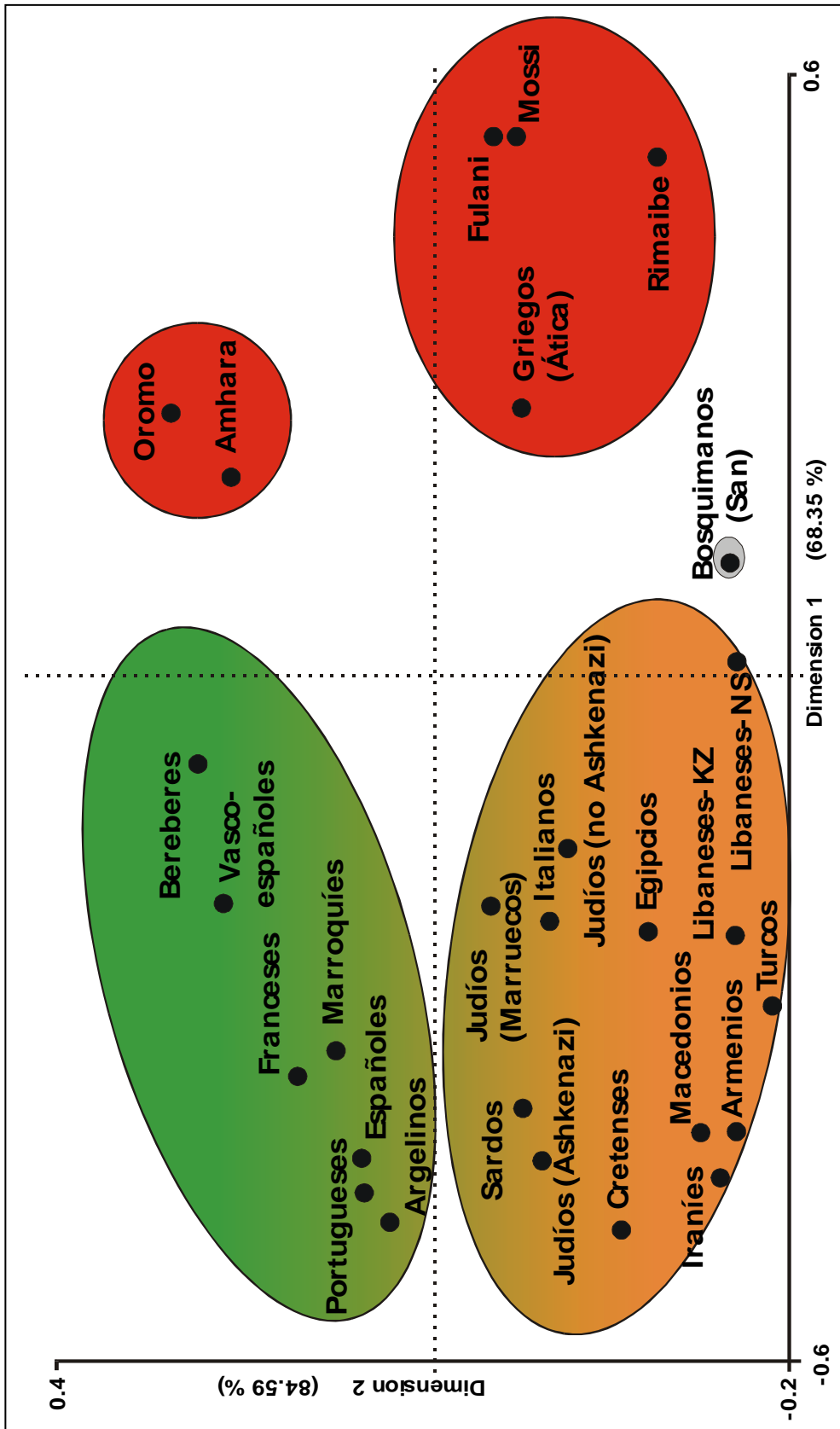
**Figura 39.** Dendrograma neighbor-joining que muestra las relaciones filogenéticas entre cretenses y otras poblaciones. Las distancias genéticas entre las poblaciones se calcularon teniendo en cuenta las frecuencias alélicas de HLA-DRB1 y -DOB1 (baja resolución). Los valores de bootstrap mostrados son de 1000 replicaciones.

**Tabla 16.** Distancias genéticas entre la población cretense y otras poblaciones ( $\times 10^{-2}$ ) calculadas a partir de las frecuencias alélicas del locus HLA-DRB1 (alta resolución) El error estándar fue nulo para cada comparación (ver Tabla 13 para la identificación de cada población).

<b>De cretenses a:</b>	<b>HLA-DRB1</b>	<b>De cretenses a:</b>	<b>HLA-DRB1</b>
Macedonios	8.38	Griegos (Ática)	27.08
Italianos	8.93	Vascos	28.56
Judíos (Marruecos)	12.15	Negroides sudafricanos	33.34
Judíos (no	12.81	Senegaleses	36.16
Sardos	13.56	Griegos (Chipre)	37.45
Judíos (Ashkenazi)	13.64	Oromo	39.05
Franceses	13.96	Griegos (Egeo)	41.59
Españoles	14.07	Amhara	45.02
Argelinos	14.22	Mossi	53.70
Libaneses (KZ)	17.44	Fulani	58.69
Libaneses (NS)	19.01	Bosquimanos (San)	54.77
Marroquíes	19.08	Rimaibe	60.35
Bereberes	22.83		

**Tabla 17.** Distancias genéticas entre la población cretense y otras poblaciones ( $\times 10^{-2}$ ) calculadas a partir de las frecuencias de los loci HLA-DRB1 y -DQB1 (baja resolución) (ver Tabla 13 para la identificación de cada población).

<b>De cretenses a:</b>	<b>DRB1-DQB1</b>	<b>De cretenses a:</b>	<b>DRB1-DQB1</b>
Macedonios	1.27	Marroquíes	4.78
Iraníes	1.46	Bereberes	6.34
Armenios	1.82	Libaneses (NS)	6.89
Judíos (Marruecos)	2.13	Vasco-españoles	7.13
Argelinos	2.27	Negroides sudafricanos	8.25
Portugueses	2.79	Senegaleses	9.71
Judíos (Ashkenazi)	2.92	Griegos (Ática)	10.31
Franceses	3.22	Oromo	10.66
Españoles	3.23	Amhara	11.19
Judíos (no Ashkenazi)	3.32	Bosquimanos (San)	13.32
Libaneses (KZ)	3.62	Japoneses	17.59
Italianos	3.65	Mossi	20.76
Turcos	3.88	Fulani	22.44
Sardos	3.90	Rimaibe	24.58
Egipcios	4.08		



**Figura 40.** Análisis de correspondencia que muestra una visión global de las relaciones filogenéticas entre los cretenses y otras poblaciones, de acuerdo a las distancias genéticas calculadas con las frecuencias alélicas de HLA-DRB1 y -DQB1 (baja resolución).

## 4. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS BI-LOCUS EN LA POBLACIÓN CRETENSE

Los haplotipos bi-locus encontrados en la población cretense fueron comparados con los recogidos en el 11º y 12º Taller Internacional de Histocompatibilidad (*Imanishi y col. 1992b; Clayton y Lonjou 1997*), y los descritos en españoles (*Martínez-Laso y col. 1995*), vasco-españoles (*Martínez-Laso y col. 1995*), argelinos (*Arnaiz-Villena y col. 1995*) y marroquíes (*Gómez-Casado y col. 2000*).

### 4.1. Desequilibrio de ligamiento entre alelos de los loci HLA de clase I y II

La muestra de población cretense analizada corresponde a individuos sanos no relacionados y no a familias. Por tanto, desconocemos cuales son los haplotipos HLA reales por su segregación en la familia. Para suplir este inconveniente se establece un estudio estadístico que aproxima el resultado a una realidad con un error del 5%.

La estimación estadística de haplotipos se realizó con el programa Arlequin (*Excoffier y Slatkin 1995*), que efectúa todas las posibles combinaciones de 2 loci, calcula la frecuencia de cada asociación haplotípica, su desequilibrio de ligamiento y la probabilidad (p) de que la asociación sea estadísticamente significativa (ver Material y Métodos). A continuación se describen aquellos haplotipos con desequilibrio de ligamiento positivo ( $D > 0$ ) y  $p < 0.05$  (Tabla 18).

#### 4.1.1 Desequilibrio de ligamiento entre alelos de HLA-A y -B

Los haplotipos HLA-A-B encontrados en la población cretense y en otras poblaciones, pero que están ausentes en las poblaciones griegas son:

- *A26-B35* (2.9%). Este aparece también en albaneses (1.4%).
- *A23-B35* (2.6%). Presente en africanos occidentales (4.3%).
- *A32-B51* (1.5%). Aparece en hindúes Tribal (3%).
- *A2-B52* (1.4%). Presente en los mongoles Buriat (2.8%) y albaneses (1.2%).
- *A3-B51* (1.5%). Compartido por los Uygur de China (2.8%), una población de los Urales (2.6%), austriacos (2%), franceses (1.3%) y españoles (0.9%).
- *A33-B8* (0.7%). Presente en la población Burushaski de Pakistán (4.1%).
- *A33-B58* (0.7%). Aparece en la población africana sub-sahariana Fulani (1.2%).
- *A30-B51* (1.5%), *A25-B55* (0.7%), *A26-B40* (0.7%), *A29-B53* (0.7%), *A32-B7* (0.7%), *A33-B38* (0.7%). Estos haplotipos no se han definido en otras poblaciones. Cada uno de estos aparece dos veces en la muestra de población cretense, salvo el primero que aparece en cuatro ocasiones.

**Tabla 18.** Haplotipos HLA-A-B, B-DRB1 y DRB1-DQB1 con desequilibrio de ligamiento significativo en la población cretense.

Haplotipos	FH	D	D'	Haplotipos	FH	D	D'
<b>A-B</b>							
A26-B35	2.9	2.2 <sup>c</sup>	0.54	B40-0405	0.7	0.7 <sup>f</sup>	0.49
A23-B35	2.6	1.6 <sup>a</sup>	0.32	B49-1501	0.7	0.7 <sup>b</sup>	0.38
A24-B18	2.2	1.7 <sup>b</sup>	0.36	B52-15021	0.7	1.7 <sup>h</sup>	1.00
A1-B8	1.8	1.6 <sup>d</sup>	0.51	B55-1302	0.7	0.6 <sup>a</sup>	0.26
A3-B51	1.5	1.1 <sup>a</sup>	0.21	B58-03011	0.7	0.6 <sup>a</sup>	0.46
A30-B51	1.5	1.2 <sup>c</sup>	0.40				
A32-B51	1.5	1.3 <sup>d</sup>	0.54				
A2-B52	1.4	0.9 <sup>a</sup>	0.47				
				<b>DRB1-DQB1</b>			
A30-B13	1.1	1.0 <sup>d</sup>	0.35	0701-02	10.4	8.1 <sup>h</sup>	0.92
A25-B55	0.7	0.7 <sup>c</sup>	0.31	1104-0301	9.6	6.9 <sup>h</sup>	0.95
A26-B40	0.7	0.7 <sup>b</sup>	0.47	1101-0301	8.9	6.1 <sup>h</sup>	0.80
A29-B53	0.7	0.7 <sup>b</sup>	0.31	0301-02	7.4	5.0 <sup>a</sup>	1.00
A32-B7	0.7	0.6 <sup>a</sup>	0.25	1601-0502	7.4	6.6 <sup>h</sup>	0.95
A33-B8	0.7	0.6 <sup>a</sup>	0.19	0101-0501	6.3	5.5 <sup>h</sup>	1.00
A33-B14	0.7	0.6 <sup>a</sup>	0.22	0402-0302	5.2	4.7 <sup>h</sup>	1.00
A33-B38	0.7	0.7 <sup>b</sup>	0.31	1001-0501	3.7	3.2 <sup>h</sup>	1.00
A33-B58	0.7	0.7 <sup>b</sup>	0.48	1401-05031	3.7	3.5 <sup>h</sup>	0.82
				1301-0603	3.3	3.2 <sup>h</sup>	1.00
				1302-0604	2.9	2.8 <sup>h</sup>	1.00
				1501-0602	2.6	2.4 <sup>h</sup>	0.69
<b>B-DRB1</b>							
B35-0101	4.8	3.7 <sup>g</sup>	0.67	0403-0302	1.8	1.5 <sup>d</sup>	0.51
B52-1502	2.5	1.7 <sup>h</sup>	0.70	1103-0301	1.8	1.2 <sup>a</sup>	0.77
B8-03011	2.2	2.0 <sup>h</sup>	0.64	12021-0301	1.8	1.3 <sup>b</sup>	1.00
B18-1104	2.0	1.3 <sup>b</sup>	0.28	0102-0501	1.5	1.3 <sup>d</sup>	1.00
B44-0701	1.6	1.1 <sup>a</sup>	0.38	0405-02	1.5	1.1 <sup>b</sup>	0.75
B51-0402	1.5	1.1 <sup>a</sup>	0.23	0404-0302	1.1	1.0 <sup>d</sup>	1.00
B7-1501	1.1	0.9 <sup>b</sup>	0.26	1502-06011	1.1	1.0 <sup>h</sup>	0.74
B13-1601	1.1	0.9 <sup>a</sup>	0.38	0701-03032	0.7	0.6 <sup>b</sup>	1.00
B14-0102	1.1	1.1 <sup>h</sup>	0.74	1502-06012	0.7	0.7 <sup>d</sup>	0.65
B57-0701	1.0	0.6 <sup>a</sup>	0.62	1404-05031	0.7	0.7 <sup>e</sup>	0.82
B14-0405	0.7	0.7 <sup>c</sup>	0.38				
B15-1302	0.7	0.6 <sup>a</sup>	0.26				
B37-1001	0.7	0.6 <sup>a</sup>	0.31				

FH, Frecuencia Haplótipica (x 100); D, desequilibrio de ligamiento (x 100); D' (o RLD), desequilibrio de ligamiento relativo. <sup>a</sup> $5 \times 10^{-2} > p > 5 \times 10^{-3}$ ; <sup>b</sup> $5 \times 10^{-3} > p > 5 \times 10^{-4}$ ; <sup>c</sup> $5 \times 10^{-4} > p > 5 \times 10^{-5}$ ; <sup>d</sup> $5 \times 10^{-5} > p > 5 \times 10^{-6}$ ; <sup>e</sup> $5 \times 10^{-6} > p > 5 \times 10^{-7}$ ; <sup>f</sup> $5 \times 10^{-7} > p > 5 \times 10^{-8}$ ; <sup>g</sup> $5 \times 10^{-9} > p > 5 \times 10^{-10}$ ; <sup>h</sup> $5 \times 10^{-10} > p > 5 \times 10^{-11}$ .

Los haplotipos que aparecen en cretenses y otras poblaciones, incluyendo alguna de las tres

poblaciones griegas son:

- *A24-B18* (2.2%). Presente en las poblaciones de Ática (5%), los vasco-franceses (3.1%), belgas (2.3%), albaneses (1.7%), armenios (1.5) e italianos (1.4%).
- *A1-B8* (1.8%). Forma parte del haplotipo extendido pan-europeo *A1-B8-DR3*. Las frecuencias más elevadas (8x) se encuentran en centroeuropeos y europeos occidentales (británicos, cornualles, checos, alemanes, vasco-españoles). Las poblaciones mediterráneas (italianos, españoles, griegos y albaneses) presentan frecuencias algo más elevadas que los cretenses.
- *A30-B13* (1.1%). Compartido por griegos de Chipre (1.5%), y con similar frecuencia por los centroeuropeos (austriacos y alemanes), vasco-franceses, europeos mediterráneos (italianos y españoles), y orientales (coreanos y los Hui de China) con mayor frecuencia.
- *A33-B14* (0.7%). Presente en los griegos de Ática (1.1%) y de Chipre (4.2%). Se considera mediterráneo y aparece principalmente en estas poblaciones con una frecuencia dos veces superior a los cretenses (españoles, vascos, argelinos, armenios, portugueses y sardos).

#### 4.1.2. Desequilibrio de ligamiento entre alelos de HLA-DRB1 y -DQB1

La mayoría de los haplotipos DRB1-DQB1 (Tabla 18) muestran desequilibrios de ligamiento habituales presentes en poblaciones mediterráneas europeas y norteafricanas. Las asociaciones DRB1-DQB1 encontradas en cretenses y otras poblaciones son:

- *DRB1\*0701-DQB1\*02* (10.4%). Presenta una frecuencia muy elevada en poblaciones africanas (bosquimanos, senegaleses), mediterráneos caucasoides y norteafricanos (italianos, sardos, españoles, vascos, argelinos, judíos Ashkenazi, judíos no Ashkenazi, judíos marroquíes), centroeuropeos (alemanes, rumanos) y baja frecuencia en orientales salvo los coreanos.
- *DRB1\*1104-DQB1\*0301* (9.6%). Se encuentra principalmente en poblaciones mediterráneas (italianos, sardos, españoles, argelinos, judíos Ashkenazi, judíos no Ashkenazi y judíos marroquíes).
- *DRB1\*1101-DQB1\*0301* (8.9%). Es característico de caucasoides (franceses, alemanes, italianos, rumanos), negroides sudafricanos y sardos. Presenta menor frecuencia en los norteafricanos (marroquíes, judíos Ashkenazi y no Ashkenazi, argelinos) e íberos (españoles y vascos). Aparece con frecuencia intermedia en hindúes, y baja frecuencia en orientales (japoneses y coreanos).
- *DRB1\*0301-DQB1\*02* (7.4%). Es un haplotipo de elevada frecuencia en poblaciones sudafricanas (negroides sudafricanos, hotentotes), norteafricanas (argelinos, judíos Ashkenazi, judíos no Ashkenazi, marroquíes), y europeas en general (daneses, franceses, alemanes, italianos, rumanos, sardos, españoles, vascos). Esta asociación forma dos haplotipos extendidos que diferencian estas poblaciones; *A1-B8-DR3* característico de poblaciones norte y centroeuropeas, y *A30-B18-DR3* característico de los vascos, españoles, sardos y argelinos.



- *DRB1\*1601-DQB1\*0502 (7.4%)*. Presenta una frecuencia muy elevada en el aislado sardo y en senegaleses. En menor frecuencia se ha encontrado en otros mediterráneos (italianos, españoles, judíos Ashkenazi, judíos no Ashkenazi, argelinos, marroquíes).
- *DRB1\*0101-DQB1\*0501 (6.3%)*. Se encuentra principalmente en poblaciones caucasoides (daneses, franceses, alemanes, rumanos, vascos), mediterráneas (sardos, argelinos, marroquíes, judíos Ashkenazi, españoles), asiático-orientales (hindúes, japoneses, coreanos) y negroides (hotentotes, negroides norteamericanos).
- *DRB1\*0402-DQB1\*0302 (5.2%)*. Encontrado fundamentalmente en mediterráneos como españoles, marroquíes, argelinos, judíos Ashkenazi, judíos no Ashkenazi, italianos y rumanos.
- *DRB1\*1401-DQB1\*05031 (3.7%)*. Presente con frecuencia similar en mediterráneos (italianos, sardos, marroquíes, argelinos, judíos Ashkenazi, judíos no Ashkenazi, españoles y vascos).
- *DRB1\*1001-DQB1\*0501 (3.7%)*. Aparece con frecuencia similar en mediterráneos europeos y norteafricanos (sardos, marroquíes, argelinos, españoles, judíos Ashkenazi, judíos no Ashkenazi), orientales (coreanos) y negroides (senegaleses y negroides sudafricanos).
- *DRB1\*1301-DQB1\*0603 (3.3%)*. Es de mayor frecuencia en centroeuropeos y europeos occidentales (daneses, franceses, alemanes, vascos), mediterráneos norteafricanos y europeos (italianos, argelinos, judíos Ashkenazi, judíos no Ashkenazi). Tiene frecuencia similar en negroides (bosquimanos, hotentotes, negroides norteamericanos) y en hindúes aparece con una frecuencia similar a los europeos.
- *DRB1\*1302-DQB1\*0604 (2.9%)*. Aparece con el doble de frecuencia que en cretenses en coreanos, marroquíes, bosquimanos, y con similar frecuencia en japoneses, daneses, argelinos, vascos, italianos, alemanes, franceses y españoles.
- *DRB1\*1501-DQB1\*0602 (2.6%)*. Los hotentotes poseen la máxima frecuencia. Es muy frecuente en caucasoides (daneses, franceses, alemanes, italianos, vascos), algunos mediterráneos norteafricanos (argelinos y marroquíes) y orientales (japoneses, chinos de Singapur).
- *DRB1\*0403-DQB1\*0302 (1.8%)*. Se encuentra en mediterráneos caucasoides y norteafricanos con mayor frecuencia que en cretenses (argelinos, vascos, judíos no Ashkenazi, judíos Ashkenazi, franceses), en otros mediterráneos con menor frecuencia que en cretenses (españoles, marroquíes, italianos). También se encuentra con frecuencia similar en orientales (japoneses y chinos de Singapur).
- *DRB1\*12021-DQB1\*0301 (1.8%)*. Este haplotipo es característico de orientales (chinos de Singapur-7.4%, Buyi-4.8%, japoneses-1.7%) y en argelinos con menor frecuencia que en cretenses.
- *DRB1\*0405-DQB1\*02 (1.5%)*. Se ha encontrado con una frecuencia similar únicamente egipcios del oasis de Siwa (1.9%), y en turcos como haplotipo genérico DR4-DQ2 (*Arnaiz-Villena y col. 2000*, resultados no publicados).
- *DRB1\*0404-DQB1\*0302 (1.1%)*. Presente en hindúes-3.4%, y con similar frecuencia que en cretenses en rumanos, españoles, franceses y argelinos.

### 4.1.3. Desequilibrio de ligamiento entre alelos de HLA-B y -DRB1

Los haplotipos HLA-B-DRB1 encontrados en la población cretense (Tabla 18) fueron comparados con los recogidos en el 11º y 12º Taller Internacional de Histocompatibilidad (*Imanishi y col. 1992b; Clayton y Lonjou 1997*), y los descritos en españoles (*Martínez-Laso y col. 1995*), vasco-españoles (*Martínez-Laso y col. 1995*), argelinos (*Arnaiz-Villena y col. 1995*) y marroquíes (*Gómez-Casado y col. 2000*). Además, excepto en estos cuatro últimos estudios, las frecuencias observadas en el resto de poblaciones corresponden a haplotipos genéricos B-DR debido a la falta de resolución para el locus DRB1. Los haplotipos B-DRB1 que aparecen en cretenses y otras poblaciones, incluyendo alguna de las tres poblaciones griegas son:

- *B35-DRB1\*0101* (4.8%). Aparece en la población griega Ática-Egeo (1.9%), griegos de Chipre (2.6%) y otros mediterráneos con diversa frecuencia (italianos-3.2%, sardos-2.7%, españoles-1.9%). Se encuentra en europeos (rumanos, húngaros, austriacos, británicos, checos, franceses, alemanes) con similar frecuencia que en los cretenses.
- *B52-DRB1\*1502* (2.5%). Aparece en chipriotas (2.2%), españoles (1.1%), marroquíes (1.5%).
- *B8-DRB1\*03011* (2.2%). Aparece en españoles (4.8%) y vascos (6.4%), caucasoides mediterráneos y no mediterráneos con frecuencias relativamente altas.
- *B18-DRB1\*1104* (2.0%). Presente en las poblaciones griegas de Ática (11.3%), Ática-Egeo (9%), sardos (6.9%), italianos (5.3%) y españoles (1.9%).
- *B51-DRB1\*0402* (1.5%). Compartido por las poblaciones griegas de Ática (3.3) y Chipre (4%).
- *B57-DRB1\*0701* (1.0%). Aparece en griegos de Ática (1.5%), argelinos (3.4%), vascos (2.1%), españoles (1.4%), hindúes (5.8%) y judíos libaneses (3.7%).
- *B14-DRB1\*0405* (0.7%). Aparece en Ática (0.4%) y en los albaneses (2.4%)

Los haplotipos que aparecen en cretenses y otras poblaciones, pero que no se encuentran en ninguna de las tres poblaciones griegas son:

- *B44-DRB1\*0701* (1.6%). Presente con una frecuencia cuatro veces superior en caucasoides (cornualles, checos, británicos, daneses, franceses, alemanes) e íberos (vascos, españoles, portugueses); otros mediterráneos (italianos y albaneses) con una frecuencia dos veces superior a los cretenses; y asiáticos-orientales (hindúes, coreanos, manchú de China, tailandeses) con una frecuencia tres veces superior a los cretenses.
- *B7-DRB1\*1501* (1.1%). Es común en austriacos (8.9%) y vascos (7.1%), en mediterráneos (más en españoles que en albaneses), Zimbabwe (4.1%), armenios (3.2%) y negroides sudafricanos (2.7%) entre otros.
- *B13-DRB1\*1601* (1.1%). Aparece en rumanos (2.1%) y tailandeses (1.6%)

- *B14-DRB1\*0102* (1.1%). Aparece con una frecuencia tres veces superior en armenios, argelinos, españoles y sardos. Los griegos e italianos presentan similar frecuencia a los cretenses.
- *B15-DRB1\*1302* (0.7%). Sólo aparece en italianos (1.4%).
- *B40-DRB1\*0405* (0.7%). Presente en eslovenos (1.7%) y judíos libaneses (4.0%).
- *B58-DRB1\*03011* (0.7%). Aparece en la población negroide Mandeka (3.9%).
- *B37-DRB1\*1001* (0.7%), *B49-DRB1\*1501* (0.7%) y *B55-DRB1\*1302* (0.7%) se han detectado únicamente en cretenses y cada uno de ellos aparece 2 veces en la muestra de población analizada.

## 5. HAPLOTIPOS EXTENDIDOS PRESENTES EN LA POBLACIÓN CRETENSE.

Los haplotipos extendidos más frecuentes en la población cretense (Tabla 19) fueron deducidos a partir de los haplotipos de 2 loci, 3 loci y 4 loci. También se han considerado aquellos haplotipos que no fueron estimados estadísticamente por el programa informático pero que estaban presentes en al menos 2 individuos y mostraban un haplotipo alternativo descrito previamente (ver Materiales y Métodos).

Los principales haplotipos extendidos son:

- *A26-B35-DRB1\*1601-DQA1\*0102-DQB1\*0502*. Este haplotipo se ha encontrado en albaneses (1.4%), rumanos (2.8%) y sardos (3.9%) (*Imanishi y col. 1992b*).
- *A24-B35-DRB1\*0101-DQA1\*0101-DQB1\*0501*. Haplotipo presente también en austriacos (2.4%), británicos (3.1), cornualles (2.5%), checos (2.8%), franceses (1.5%), alemanes (1.3%), italianos (3.2%), rumanos (4.1%), sardos (2.7%), judíos Ashkenazi (2.5%), españoles (1.9%) y húngaros (3.6%) (*Imanishi y col. 1992b; Roitberg-Tambur y col. 1995*).
- *A23-B35-DRB1\*1101-DQA1\*0501-DQB1\*0301*. Este muestra su mayor frecuencia en italianos (7.2%), armenios (4.4%), y se ha encontrado en menor frecuencia en hindúes (3.2%), portugueses (2.0%), españoles (1.7%) y franceses (1.1%) (*Imanishi y col. 1992b*).
- *A1-B8-DRB1\*03011-DQA1\*0501-DQB1\*02*. También encontrado en vascos (2.4%), españoles (3.4%), británicos (2.9%) y daneses (3.4%) con frecuencias similares. Los alemanes (4.8%), austriacos (5.3%), y yugoeslavos (7.7%) muestran frecuencias moderadamente mayores (*Imanishi y col. 1992b; Arnaiz-Villena y col. 1997*).
- *A2-B13-DRB1\*1601-DQA1\*0102-DQB1\*0502*. Haplotipo presente sólo en cretenses.

• *A33-B14-DRB1\*0102-DQA1\*0101-DQB1\*0501*. Muestra la mayor frecuencia en armenios (3.1%) y está también en alta frecuencia en otros caucasoides mediterráneos como los sardos (2.7%), españoles (2.6%), franceses (1.4%), griegos (1.1%) e italianos (0.7%) (*Imanishi y col. 1992b; Martínez-Laso y col. 1995*).

• *A30-B13-DRB1\*0701-DQA1\*02-DQB1\*02*. Este es un haplotipo mediterráneo presente en españoles (0.4%), la población de Pavía (1.5%), marroquíes (1.1%) y los griegos de Chipre (como A30-B13-DR7, 1.1%). También se ha encontrado en la Península Arábiga y Oriente Medio (*Degos y Dausset 1974; Martínez-Laso y col. 1995*).

**Tabla 19.** Haplotipos extendidos HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 y -DQB1 más frecuentes en la población cretense.

Haplotipos	FH (%)	Origen Posible
A26-B35-DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502	1.5	Mediterráneo
A24-B35-DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501	1.1	Pan-Europeo
A23-B35-DRB1*1101-DQA1*0501-DQB1*0301	1.1	Mediterráneo
A1-B8-DRB1*03011-DQA1*0501-DQB1*02	1.1	Pan-Europeo
A2-B13-DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502	0.8	Específico (Minoico ?)
A33-B14-DRB1*0102-DQA1*0101-DQB1*0501	0.4	Mediterráneo
A30-B13-DRB1*0701-DQA1*02-DQB1*02	0.4	Mediterráneo
A2-B7-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	0.4	Europeo-vasco-Norte-Africano

• *A2-B7-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602*. Común a vasco-franceses (3.6%), cornualles (3.6%), austriacos (2.6%), bretones (2.3%), españoles (1.9%), vasco-españoles (1.8%), argelinos (0.9%), marroquíes y otros mediterráneos (*Imanishi y col. 1992b; Arnauz-Villena y col. 1995; Martínez-Laso y col. 1995; Gómez-Casado y col. 2000*).

# **DISCUSIÓN**

# 1. RELACIONES GENÉTICAS HLA E HISTÓRICAS ENTRE LOS MEDITERRÁNEOS

## 1.1 Mediterráneos occidentales: íberos y norteafricanos

Estudios anteriores habían mostrado el perfil genético HLA similar entre los españoles, vascos, portugueses y argelinos, estos últimos probablemente de origen bereber (*Arnaiz-Villena y col. 1995, 1997; Martínez-Laso y col. 1995*). Los árboles filogenéticos, distancias genéticas y análisis de correspondencia realizados indican que los marroquíes (El Jadida), al igual que la mayoría de los actuales norteafricanos de Marruecos y Argelia, están genéticamente relacionados con los bereberes (Agadir, Marruecos) y los íberos (españoles, vascos y portugueses). Se observa un gradiente poblacional de oeste a este, en el que los mediterráneos occidentales, tanto los norteafricanos como los europeos, tienden a agruparse y diferenciarse de los mediterráneos orientales (cretenses, judíos y libaneses) que se encuentran más inter-relacionados. Este hecho es particularmente evidente en el dendrograma y el análisis de correspondencia obtenidos con datos de DRB1 de alta resolución (Figuras 35 y 36).

**Tabla 20.** Influencias poblacionales en la Península Ibérica<sup>a</sup>.

Época	Número de habitantes	Tiempo (años)	Entrada de Población	Tamaño de Entrada
Paleolítico (pinturas de Altamira)	5.000	20.000 aC		
Mesolítico (clima más caluroso)	50.000	8.000 aC	Norteafricanos	Medio (?) <sup>b</sup>
Neolítico (agricultura)	50.0000	4.000 aC	Saharianos	Medio-grande (?)
Edad de Bronce	2.000.000	1.000 aC	Griegos	Pequeño
			Fenicios	Pequeño
			Centro-Europeos ('Celtas')	Grande (20-40%) <sup>c</sup>
Dominio Romano	4.000.000	100	Romanos	Pequeño
Invasiones Bárbaras-Caída Imp. Romano	3.500.000	600	Germánicos	Pequeño
Dominio Árabe	4.000.000	800	Árabes	≅ 30.000 <sup>d</sup>
Fin del Dominio Árabe	8.000.000	1.492		
		40.000.000 <sup>#</sup>	Presente	

<sup>a</sup> Los números son aproximados, de acuerdo a McEvedy y Jones (1978), Ramos-Oliveira (1971a, b), y García-Bellido (1985).

<sup>b</sup> Sólo algunos investigadores aceptan esta inmigración.

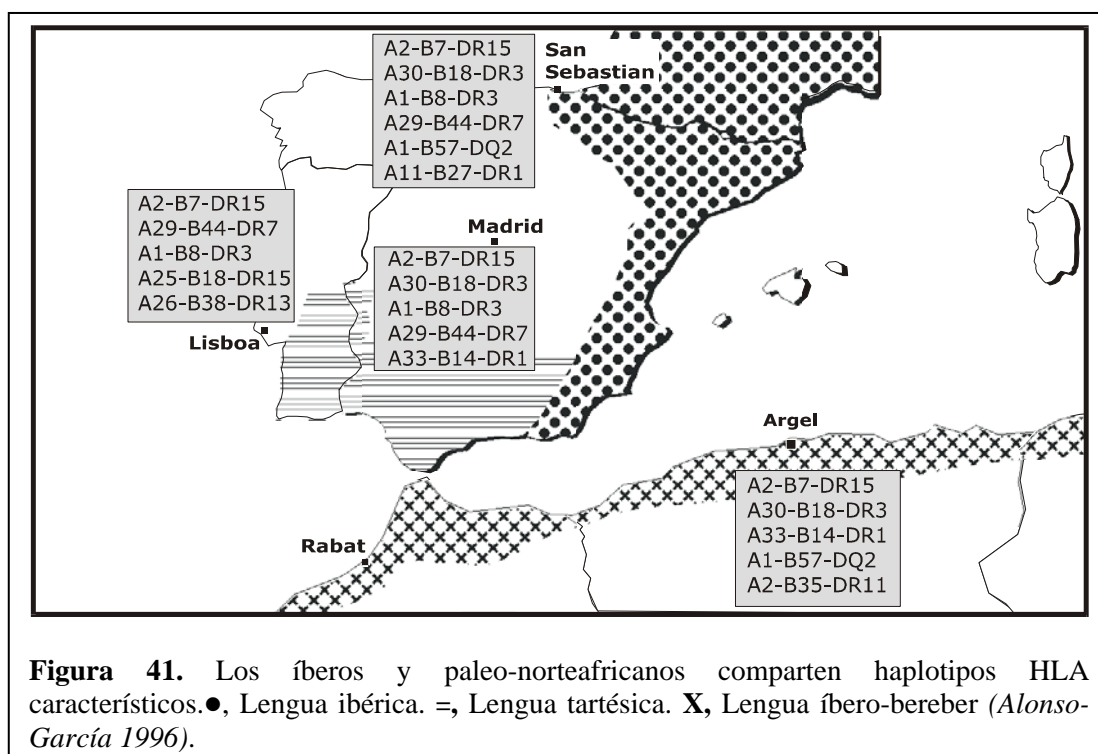
<sup>c</sup> La cantidad de individuos que entraron en la Península Ibérica durante el primer milenio a. C. se considera menor actualmente que lo inicialmente postulado (*Burillo-Mozola 1998*).

<sup>d</sup> Muchos de los invasores eran de lengua bereber o *Tamazights* (paleo-norteafricanos) recientemente convertidos al Islam (*Kinder y Hilgemann 1970; Gonem 1996*).

<sup>e</sup> Datos referidos a España; Portugal habría sufrido un incremento cualitativo y cuantitativo paralelo de población (*McEvedy y Jones 1978*), con una población actual aproximada de 1.000.000.

Los antecedentes históricos y culturales sugieren que el flujo genético fue pequeño durante la invasión del norte de África por parte de los árabes procedentes de la península Arábiga y Oriente

Medio en el siglo VII. Los árabes reclutaron un ejército de bereberes y posteriormente ocuparon España (siglo VIII) hasta 1492. El número de invasores árabes fue probablemente pequeño comparado con el número de bereberes establecidos en el norte de África. Sin embargo, no cabe duda de la influencia cultural árabe durante su ocupación; la lengua árabe (fusionada con el bereber) se habla en gran parte de los estados de la costa sur mediterránea. Las relaciones entre íberos y norteafricanos, no sólo son genéticas como muestran los dendrogramas, los análisis de correspondencia y la presencia de haplotipos compartidos (Figura 41), sino también históricas (Tabla 20), lingüísticas y culturales (Arnaiz-Villena y Alonso García 1998, 2000).



## 1.2. Mediterráneos orientales

### 1.2.1. Cretenses, macedonios, libaneses y judíos

Teniendo en cuenta las distancias genéticas respecto a los cretenses, los macedonios y judíos son los más cercanos y los libaneses se sitúan entre los mediterráneos occidentales (Tablas 15 y 16); en definitiva, se observa un gradiente de distancias genéticas entre las poblaciones mediterráneas orientales y occidentales que indica la relación genética entre ellos. Por otro lado, los griegos están muy alejados de los mediterráneos, en especial de cretenses y macedonios (Tablas 15, 16 y 17); los

dendrogramas y los análisis de correspondencia muestran de forma más evidente estas relaciones genéticas (Figuras 35-40).

Estos hallazgos genéticos y otros previamente publicados (*Bonné-Tamir y col. 1978; Brautbar y col. 1992; Martínez-Laso y col. 1996*) se pueden contrastar con diferentes hechos históricos postulados y quizá esclarecer la historia de estas poblaciones basado en su genómica:

1) Según el clásico griego Herodoto, los macedonios provenían de las montañas Pindo en la actual Grecia (*Herodotus 1989*). Los griegos consideraban a los macedonios como bárbaros que hablaban una lengua “diferente”. El antiguo macedonio se ha considerado como una lengua Usko-mediterránea (*Arnaiz-Villena y Alonso-García 2000*) entre las que se encuentran el vasco, bereber, íbero-tartésico y minoico (ver apdo. 3 de Discusión). Macedonios y griegos estuvieron enfrentados hasta que Alejandro Magno, de origen macedonio, venció definitivamente a los griegos, extendiendo su imperio hacia el este de Europa y Asia central. Los resultados genéticos obtenidos apoyan la teoría de que los macedonios son uno de los pueblos más antiguos de la Península Balcánica, probablemente muy anteriores a la llegada de los griegos micénicos (hacia 2000 a. C.). Otra posible teoría es que macedonios, griegos y el resto de mediterráneos tuvieran un substrato genético muy similar antes de que los griegos se diferenciaron debido a su mezcla con los sub-saharianos (ver apdo. 2 de Discusión).

2) los judíos de Europa Central, Rusia, Marruecos y del Mediterráneo han permanecido relativamente aislados, con poco flujo o intercambio genético de poblaciones vecinas, después de la última Diáspora (anterior a 135 d. C.).

Antes del segundo milenio, los fenicios junto con los judíos fueron considerados como la rama occidental de los antiguos nómadas semitas. Los fenicios, nombre que los griegos dieron a los cananeos, se instauraron durante el III milenio a. C. en la franja Sirio-Palestina y fundaron numerosas ciudades estado. Las difíciles condiciones climáticas de la zona les obligaron a dedicarse a la navegación, el trueque y la industria. Mientras, en Palestina, el pueblo judío se hizo sedentario y adoptó la monarquía como forma de gobierno. Con los reyes David y Salomón, Judea se convirtió en un estado muy poderoso, pero tras la muerte de Salomón el país se dividió en dos estructuras muy débiles: Israel y Judea (o Judá) (Figura 42).

La rama oriental semita la constituían los Acadios, Amorritas y Arameos que adoptaron la cultura Sumeria (*Sellier y Sellier 1993*); los Arameos invadieron la baja Mesopotamia tomando entonces el nombre de Caldeos. La lengua Aramea dominó y se extendió por los pueblos del Medio Este, incluyendo Mesopotamia en los tiempos del Nuevo Testamento. El Arameo sólo fue sustituido por el árabe en el siglo VI d. C.

3) En la actualidad, parte de los libaneses son una mezcla de las poblaciones antiguas descritas en el Antiguo y Nuevo Testamento (*Sellier y Sellier 1993*); sin embargo, estas muestran una



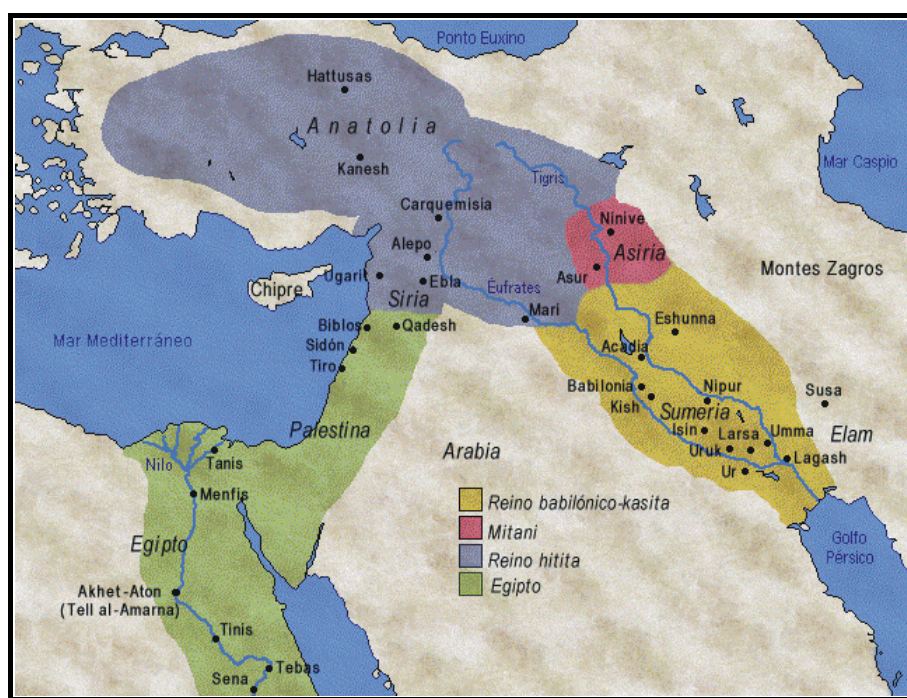
relación genética estrecha con los judíos, macedonios, cretenses y otros mediterráneos orientales. Esto sugiere que los pueblos semitas se distinguen principalmente por diferencias de lenguaje. Además, los actuales libaneses de lengua árabe también están relacionados genéticamente con los mediterráneos occidentales europeos y norteafricanos (italianos, argelinos, españoles, bereberes), como muestran los dendrogramas (Figuras 35 y 37) construidos a partir de DRB1 de alta resolución y los correspondientes análisis de correspondencia (Figuras 36 y 38).

### **1.2.2. Egipcios, turcos, armenios e iraníes**

El estudio y comparación de estas poblaciones sólo fue posible utilizando datos de frecuencias HLA-DRB1 y -DQB1 de baja resolución. Tomando a los cretenses como población de referencia, las distancias genéticas de las poblaciones más cercanas a estos son los macedonios ( $1.27 \times 10^{-2}$ ), seguidos de los iraníes ( $1.46 \times 10^{-2}$ ) y armenios ( $1.82 \times 10^{-2}$ ) (Tabla 17). Los turcos ( $3.88 \times 10^{-2}$ ) y egipcios ( $4.08 \times 10^{-2}$ ) se sitúan entremezclados con poblaciones mediterráneas occidentales, pero más relacionados que los griegos ( $10.31 \times 10^{-2}$ ). El dendrograma construido con las distancias genéticas (Figura 39) relaciona en una rama a iraníes, macedonios cretenses, turcos, armenios judíos y libaneses. El análisis de correspondencia (Figura 40), que muestra una visión global entre las poblaciones, agrupa respectivamente los mediterráneos occidentales y los orientales: egipcios, turcos, armenios, iraníes, cretenses, macedonios, judíos y libaneses. En definitiva, los resultados obtenidos con este análisis indica que la composición genética HLA en estas poblaciones es similar a la de cretenses y el resto de mediterráneos principalmente orientales, sobre todo cuando se comparan con los griegos quienes siempre aparecen más alejados. Por otra parte, el estudio de polimorfismos de proteínas también relaciona a los turcos con otros mediterráneos antiguos (*Brega y col. 1998*).

Históricamente, hacia el año 1600 a. C. se conoce la existencia del reino hitita en Anatolia. En 1500 a. C. existen cuatro reinos importantes en la región: el babilónico, hitita, egipcio y mitani (Figura 42). Hacia 1400 a. C., egipcios, hititas y mitani se disputan el territorio sirio, venciendo finalmente los hititas. Los “Pueblos del Mar” son los que en el año 1300 a. C. terminan con el dominio hitita (*Arnaiz-Villena y Alonso-García 2001c*).

Se ha postulado que alrededor del siglo X, tribus centroasiáticas comenzaron a migrar, desde las montañas Altai y el lago Aral, hacia Anatolia, Irán y Azerbaiján. Comenzaron su expansión por parte de Europa y el mediterráneo cuando el imperio bizantino sucumbió en 1453. Finalmente, los turcos se asentaron en la actual Turquía después de la Primera Guerra Mundial.



**Figura 42.** Los cuatro reinos importantes en Oriente Medio y Próximo hacia 1500 a.C.

Los iraníes están considerados como una de las dos ramas de los pueblos indoeuropeos (*Sellier y Sellier 1993*) procedentes de Asia central alrededor del primer milenio a. C.; la segunda rama habría migrado a la India. Los iraníes siempre fueron considerados como extraños en la cultura mediterránea, e históricamente no deberían compartir un sustrato mediterráneo antiguo. Sin embargo, los datos HLA presentados se oponen a esta hipótesis. Además, estudios lingüísticos realizados sobre antiguos textos iraníes (elamita) indican gran homología con otras antiguas lenguas mediterráneas (*Arnaiz-Villena y Alonso García 2000*). Las constantes disputas y movimientos de población en estas regiones geográficas conllevaron cierto flujo genético, que no ha eliminado con el tiempo un fuerte sustrato mediterráneo compartido por las poblaciones autóctonas de estas regiones.

Los armenios tienen la creencia de que provienen de los antiguos urartitas, relacionados con los hurritas de lengua indoeuropea que se asentaron en el lago Van (*Cotterel 1980*). Muchos son los conflictos mantenidos a lo largo de la historia; asirios, cimerios, medas, babilonios y escitas debilitaron a Urartu dando paso a los armenios. Estos, entre los años 900 y 1400 d. C. fueron atacados y deportados por los bizantinos, turcos y musulmanes. La Diaspora armenia podría haber extendido por el mediterráneo su haplotipo característico A33-B14-DR1, incluyendo las poblaciones mediterráneas más occidentales (íberos y norteafricanos).

Los resultados obtenidos de las comparaciones genéticas de los actuales turcos, iraníes y armenios muestran un origen mediterráneo, predominantemente oriental. Este hecho sugiere que las tribus que migraron de Asia central hacia Anatolia, Irán y regiones circundantes no aportaron un

substrato genético importante; es probable que las poblaciones autóctonas de la zona se dieran invasiones de tipo “elite”, es decir, una imposición militar y cultural de reducidos grupos de invasores. Además, la relación genética entre estos antiguos mediterráneos se ve apoyada por la lingüística ya que investigaciones recientes han demostrado que sus lenguas actuales provienen de una ancestral común llamada Usko-Mediterránea (*Arnaiz-Villena y Alonso-García 2000*).

### 1.3. Análisis de Haplotipos

El estudio de los desequilibrios de ligamiento entre dos loci (A-B, B-DRB1) en la población actual de Creta nos indica, en primer lugar, la ausencia de una elevada frecuencia de alguno de ellos, al contrario que en aislados genéticos como los vascos y sardos (*Martínez-Laso y col. 1995*).

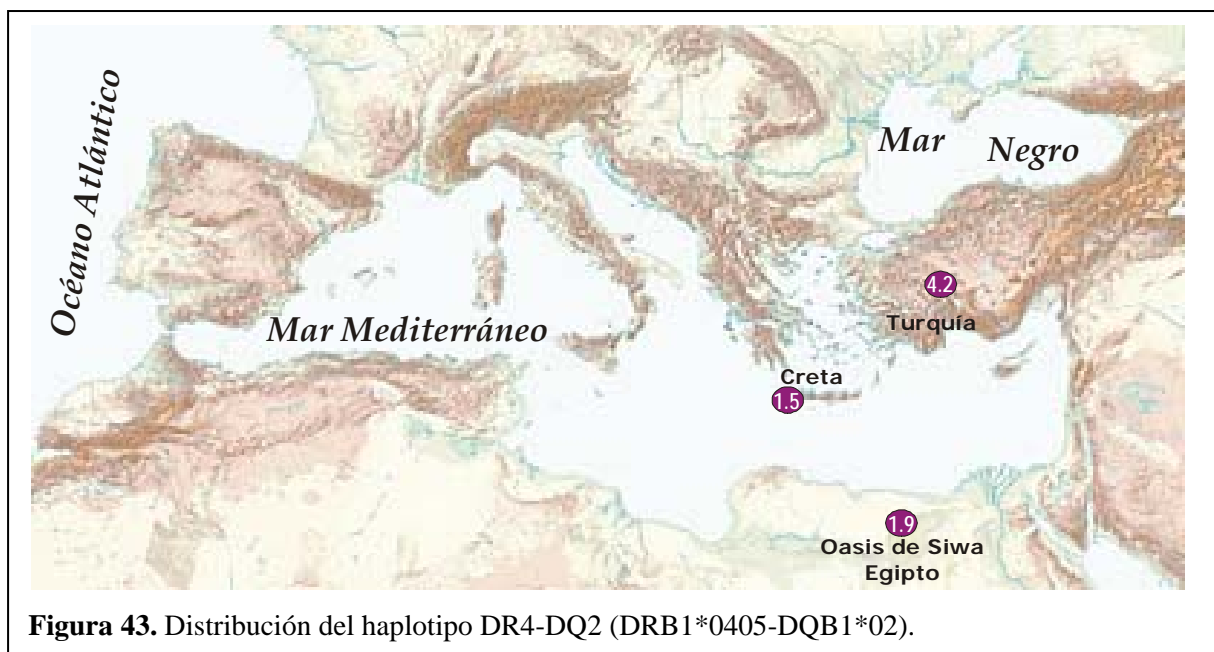
De los 26 haplotipos HLA-A-B estadísticamente significativos encontrados en el conjunto de las poblaciones griegas sólo 4 son compartidos por los cretenses y otras poblaciones comparadas: de origen Mediterráneo (A24-B18, A30-B13, A33-B14) y pan-europeo (A1-B8).

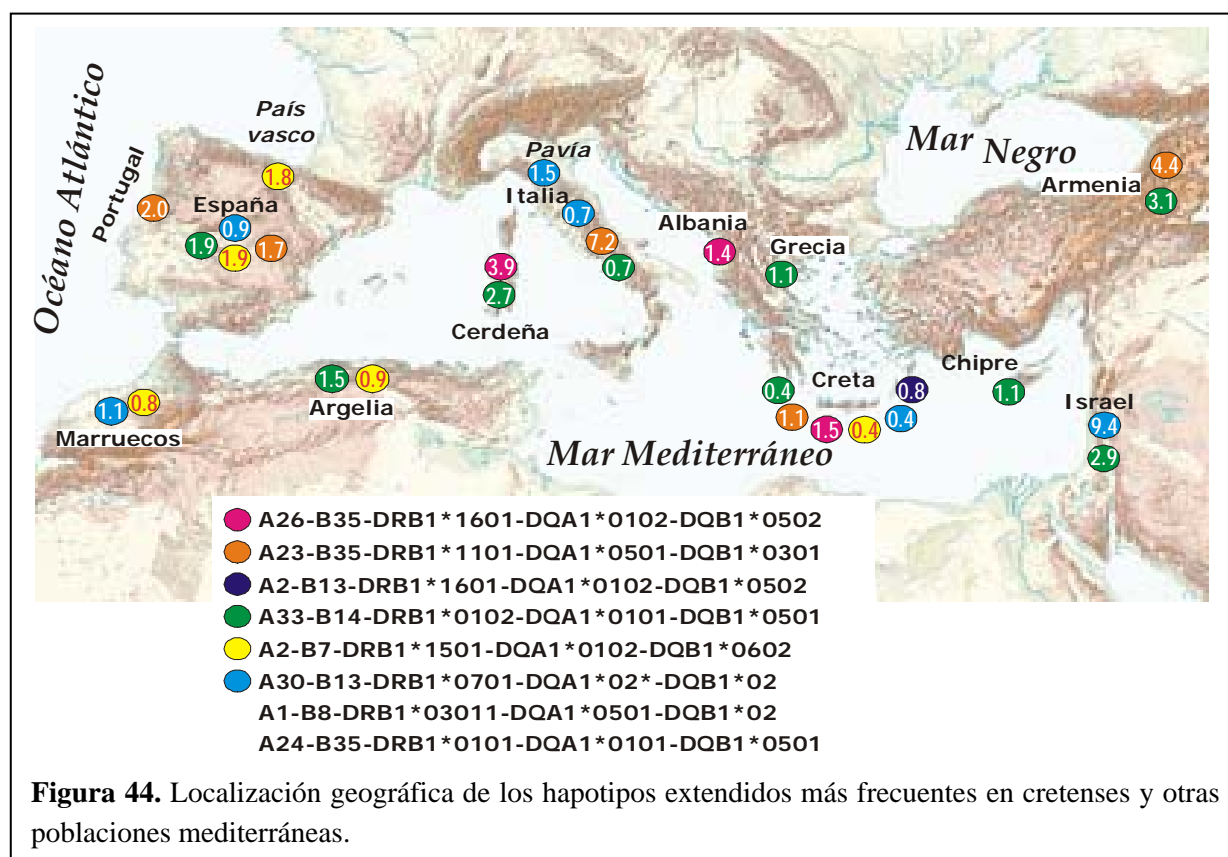
Para HLA-B-DR, y teniendo en cuenta alelos genéricos de DR de los griegos, estos y cretenses sólo comparten 7 de los 27 haplotipos estadísticamente significativos encontrados en el conjunto de las tres poblaciones griegas; B35-DR1 (\*0101, mediterráneo), B52-DR15 (\*1502, griego-chipriotas, españoles, vascos y norteafricanos), B8-DR3 (\*0301, pan-europeo), B18-DR11 (\*1104, españoles y griegos de las islas y Ática), B51-DR4 (\*0402, griegos de Ática y Chipre), B57-DR7 (\*0701, griegos de Ática y argelinos), B14-DR4 (\*0405, griegos de Ática y albaneses). Estos datos confirman las diferencias genéticas entre los cretenses y los griegos, no sólo en cuanto a frecuencias de alelos HLA sino también a la formación de haplotipos en cada población.

El resto de los desequilibrios de ligamiento entre dos loci encontrados en la población cretense, y ausentes en griegos, son compartidos en su gran mayoría por los antiguos mediterráneos (ver Resultados). Hay que destacar el haplotipo DR4-DQ2 presente en cretenses, egipcios y turcos; si bien los egipcios y cretenses presentan el mismo haplotipo por alta resolución DRB1\*0405-DQB1\*02 con frecuencia similar (*Clayton y Lonjou 1997*), en los turcos no se ha podido identificar aún el subtipo de DR4 (Figura 43, *Arnaiz-Villena y col. 2001b*). No es posible definir un haplotipo extendido para este marcador en los cretenses y turcos, y se carecen de datos en los egipcios, pero la exclusividad de su presencia apoya la relación genética entre estas poblaciones, observada anteriormente con las distancias genéticas de DR y DQ genéricos.

Por otra parte, no ha sido posible comparar los desequilibrios de ligamiento entre dos loci HLA-A-B, -B-DR, y -DR-DQ, ni los haplotipos extendidos de poblaciones como los bereberes (Agadir), judíos (Ashkenazi, no Ashkenazi), iraníes, egipcios (oasis de Siwa), porque aunque conocemos sus frecuencias de DR y DQ genéricos, desconocemos las asociaciones haplotípicas que forman.

Los haplotipos extendidos estimados (A-B-DRB1-DQB1) presentan frecuencias relativamente bajas debido a que los haplotipos parciales también los encontramos en baja frecuencia. Esto indica que la población cretense ha recibido influencia genética externa y no es un aislado genético, como pone de manifiesto la presencia de los haplotipos comunes en europeos A1-B8-DR3 y A24-B35-DR1, este último presente incluso en el aislado genético sardo. Sin embargo, la mezcla con otras poblaciones no ha diluido con el tiempo una identidad genética propia, muy distinta de la presente en los nuevos mediterráneos (los griegos), y que se asemeja en su mayoría a la de otros antiguos mediterráneos compartiendo los haplotipos A26-B35-DRB1\*1601-DQA1\*0102-DQB1\*0502 (el de mayor frecuencia haplotípica, FH=1.5%), A23-B35-DRB1\*1101-DQA1\*0501-DQB1\*0301 (FH=1.1%), A33-B14-DRB1\*0102-DQA1\*0101-DQB1\*0501 (FH=0.4%) y A2-B7-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 (FH=0.4%) (Figura 44).





El haplotipo cretense de origen mediterráneo HLA-A30-B13-DRB1\*0701-DQA1\*02-DQB1\*02 (FH=0.4%) es compartido por los españoles (FH=0.9%), y también parcialmente como A30-B13-DRB1\*07 por el grupo griego-chipriota (FH=1.1%), la población de Pavía (FH=1.5%) y los marroquíes (FH=1.1%), mientras que está ausente en los griegos de las islas y se desconoce su presencia en los griegos de Ática (*Clayton y Lonjou 1997*). La presencia de este haplotipo en la colonia griega de Chipre podría indicar un flujo genético de esta con Creta, o de ambas con otras poblaciones antiguas mediterráneas; otra explicación podría ser que la muestra de población griega de Chipre no es puramente griega.

Únicamente el haplotipo HLA-A2-B13-DRB1\*1601-DQA1\*0102-DQB1\*0502 (FH=0.8%) es específico de la población cretense, y podría ser la herencia de los antiguos minoicos a través de un efecto fundador, o pudo haberse generado en Creta después de la mezcla (flujo genético) de dos poblaciones (*Degos y Dausset 1974*). Sin embargo, A2-B13 no presenta un desequilibrio de ligamiento estadísticamente significativo (ver Tabla 17 de Resultados), debido probablemente a la formación de múltiples haplotipos de A2 con variantes distintas a B13, lo que resta significación estadística en su asociación. Este haplotipo extendido podría ser confirmado en otro estudio con mayor tamaño de población cretense analizada.

#### 1.4. Exclusión de los griegos entre los mediterráneos

El estudio de las distancias genéticas para el locus DRB1 (alta resolución) indica que los cretenses se encuentran genéticamente más cercanos a los mediterráneos orientales (especialmente macedonios y judíos -Ashkenazi, -no Ashkenazi y -marroquíes) y occidentales (europeos y africanos) que a cualquiera de los grupos griegos (Ática, Chipre). De hecho, después de la distancia genética entre cretenses y vascos ( $32 \times 10^{-2}$ ), se observa una discontinuidad con el siguiente valor más próximo ( $72 \times 10^{-2}$ ) que corresponde a la distancia genética entre cretenses y griegos de Ática (ver Tabla 15 de Resultados).

Cuando se efectúan nuevos análisis con más datos (frecuencias de alelos genéricos HLA-A y -B, y alta resolución de DRB1), aunque con menor número de poblaciones porque muchas carecen de ellos, se observa que los más próximos a los cretenses son los argelinos de Argel ( $38.21 \times 10^{-2}$ ). El siguiente par poblacional más próximo se produce después de una discontinuidad ( $51.13 \times 10^{-2}$ ) y corresponde a cretenses-marroquíes. Muy cercano a este valor se encuentran los griegos de Ática ( $51.20 \times 10^{-2}$ ). El resto de grupos griegos están tan alejados como los japoneses. El efecto de que los griegos de Ática puedan mostrar una mayor relación con los cretenses que en el caso anterior se debe probablemente a dos causas: 1) menor número de poblaciones mediterráneas comparadas tanto occidentales como orientales, y 2) los datos genéricos de HLA-A y -B homogenizan las poblaciones comparadas restando capacidad de discriminación a la alta resolución del locus DRB1, es decir, dos poblaciones pueden tener el alelo genérico A1, pero distinto subtipo genético de A1.

Únicamente se ha realizado otro estudio genético en la población de Creta en el cuál se determinó el polimorfismo de ciertos microsatélites del cromosoma Y en 33 poblaciones de Europa, norte de África y oeste de Asia (*Malaspina y col. 1998*). El análisis de varianza muestra que el primer componente principal separa claramente los griegos de los cretenses, y estos a su vez presentan valores similares a los egipcios, italianos (lucanos, de la actual Basilicata), sicilianos, sardos, turcos, y árabes marroquíes.

Los datos de distancias genéticas, los correspondientes árboles de emparentamiento (dendrogramas), y los análisis de correspondencia reflejan que los griegos están muy poco relacionados con los cretenses y otros mediterráneos occidentales (tanto europeos como norteafricanos) y orientales. Los datos HLA y del cromosoma Y se complementan con los históricos, y podríamos considerar a los griegos como mediterráneos más recientes que los cretenses y el resto de mediterráneos comparados; las crónicas históricas datan la llegada de los primeros griegos indoeuropeos (pre-micénicos) a la península Balcánica sobre el segundo milenio a. C. (Figura 45). Hacia 1450 a. C. los griegos invadieron la isla de Creta, tomando la lengua Lineal A cretense como suya y convirtiéndola en Lineal B griego, y apoderándose del imperio marítimo cretense en el Egeo (Figura 46). Sin embargo, a pesar de la dominación aquea y, posteriormente dórica, el flujo genético

entre los minoicos (antiguos cretenses) y los micénicos (antiguos griegos) fue escaso, como ponen de manifiesto los resultados HLA obtenidos.



**Figura 45.** Influencia minoica en el Egeo (antes de 1450 a. C.)



**Figura 46.** Absorción de la cultura minoica por los pre-micénicos y expansión de su hegemonía en el Egeo (después de 1450 a. C.).

## 2. LOS GRIEGOS Y SUB-SAHARIANOS ESTÁN GENÉTICAMENTE RELACIONADOS

### 2.1. Alelos HLA-DRB1 característicos

Una de las razones de las diferencias filogenéticas observadas entre los griegos, los cretenses y otros mediterráneos es la presencia en algunos de los tres grupos griegos de alelos HLA-DRB1 característicos: DRB1\*0305, \*0307, \*0411, \*0413, \*0416, \*0417, \*0420, \*1110, \*1112, \*1304 y \*1310. Se analizó la posible presencia de alguno de estos alelos en los datos de otras poblaciones estudiadas en el 12º Taller Internacional de Histocompatibilidad (Clayton y Lonjou 1997). De forma sorprendente, estos alelos también se encuentran en poblaciones de Etiopía (Amhara, Oromo) Sudán (Nubios) y Burkina Faso (Mossi, Fulani, Rimaibe). Se puede deducir de estos datos que los griegos y los sub-saharianos comparten alelos DRB1 casi-específicos (Tabla 21).

**Tabla 21.** Alelos HLA-DRB1 casi-específicos de los griegos y los sub-saharianos.

Alelo DRB1	Griegos			Etiopía		Sudán	Africanos Occidentales		
	Ática	Egeo	Chipre	Amhara	Oromo	Nuba	Rimaibe	Fulani	Mossi
0305 <sup>a</sup>		2.5					0.8	0.2	0.8
0307 <sup>b</sup>		2.2	3.2	2.1		1.3	0.8	0.2	0.8
0411 <sup>c</sup>			0.4					0.6	
0413 <sup>d</sup>	0.5	0.6	0.9	0.6	0.6				
0416 <sup>e</sup>		0.6	0.9	0.6	0.6				
0417 <sup>f</sup>			0.4			1.5		0.6	
0420 <sup>g</sup>	0.1		0.4	0.6	0.6			0.6	
1110 <sup>h</sup>		2.9	1.9		0.2		0.3		
1112 <sup>i</sup>		2.9	1.9	0.4	0.2	2.7	0.3		
1304 <sup>j</sup>			0.9				1.1	1.4	0.7
1310 <sup>k</sup>			0.2			1.3	0.8	0.2	0.8

Valores expresados como frecuencias alélicas (%). Algunos de estos alelos HLA-DRB1 se encuentran presentes también en otras poblaciones: <sup>a</sup>Encontrado en húngaros (0.3%). <sup>b</sup> Presente en húngaros (0.4%). <sup>c</sup> Presente en Amerindios y algunas poblaciones del pacífico. <sup>d</sup> No encontrado en otras poblaciones. <sup>e</sup> Encontrado en húngaros (1.2%). <sup>f</sup> Presente en la isla Hva (Croacia, 0.3%) y en los Amerindios Yukpa (2.3%). <sup>g</sup> Encontrado en libaneses (0.1%). <sup>h</sup> Presente en la isla Hva (Croacia, 0.9%) y en los húngaros (2.6%). <sup>i</sup> Encontrado en los libaneses (2.3%) y húngaros (2.6%). <sup>j</sup> No encontrado en otras poblaciones. <sup>k</sup> Presente también en la isla Hva (Croacia, 1.0%) (Clayton y Lonjou 1997).



**Tabla 22.** Distancias genéticas entre los diferentes grupos griegos y otras poblaciones ( $\times 10^2$ ) calculadas a partir de las frecuencias alélicas HLA-DRB1 (alta resolución).

<b>HLA-DRB1</b>					
<b>De los Griegos (Ática) a:</b>		<b>De los Griegos (Chipre) a:</b>		<b>De los Griegos (Egeo) a:</b>	
Griegos (Egeo)	7.35	Griegos (Egeo)	5.62	Griegos (Chipre)	5.62
Griegos (Chipre)	10.01	Griegos (Ática)	10.01	Griegos (Ática)	7.35
Mossi	16.00	Mossi	13.68	Mossi	10.92
Oromo	17.11	Rimaibe	17.48	Rimaibe	12.61
Rimaibe	20.69	Oromo	18.77	Oromo	19.85
Franceses	20.87	Fulani	20.68	Fulani	20.43
Amhara	21.43	Amhara	24.10	Amhara	21.08
Marroquíes	21.86	Judíos (no Ashkenazi)	28.78	Franceses	31.76
Judíos (no Ashkenazi)	23.64	Franceses	31.74	Libaneses-NS	33.49
Macedonios	23.69	Libaneses-NS	32.08	Judíos (no Ashkenazi)	34.07
Fulani	23.85	Macedonios	33.82	Marroquíes	35.10
Italianos	26.28	Bereberes	34.43	Bereberes	37.02
Bereberes	26.53	Libaneses-KZ	35.97	Macedonios	37.52
Cretenses	27.08	Judíos (Marruecos)	36.46	Italianos	41.49
Judíos (Marruecos)	27.56	Marroquíes	36.58	Cretenses	41.59
Libaneses-NS	30.96	Cretenses	37.45	Judíos (Marruecos)	42.27
Libaneses-KZ	31.13	Italianos	41.26	Senegaleses	44.34
Espanoles	33.61	Senegaleses	43.23	Libaneses-KZ	45.12
Argelinos	33.68	Espanoles	45.25	Espanoles	51.17
Vascos	37.10	Sardos	47.75	Argelinos	51.71
Sardos	37.87	Argelinos	49.44	Negroides sudafricanos	53.48
Senegaleses	38.94	Judíos (Ashkenazi)	50.93	Sardos	53.68
Judíos (Ashkenazi)	40.10	Negroides sudafricanos	58.21	Judíos (Ashkenazi)	55.33
Negroides sudafricanos	45.37	Vascos	59.57	Vascos	56.95
Bosquimanos	62.90	Bosquimanos	70.04	Bosquimanos	66.68

El estudio de las distancias genéticas de los tres grupos griegos al resto de poblaciones, calculadas con las frecuencias HLA-DRB1 (alta resolución), muestra de forma clara que los más próximos son los sub-saharianos (Tabla 22). Los dendrogramas y los análisis de correspondencia obtenidos con las mismas distancias genéticas (Figuras 37 y 38) agrupan de forma clara estas poblaciones, confirmando la relación genética específica entre los griegos y los sub-saharianos. Esta relación se debe no sólo a los alelos DRB1 casi-específicos compartidos, sino a un perfil de frecuencias alélicas HLA muy similar. Al considerar los datos DRB1 y DQB1 (baja resolución) se tiende a homogenizar los alelos específicos por los genéricos (p.e.: DRB1\*0413 por DRB1\*04), lo que puede llevar a perder especificidad en las comparaciones. Sin embargo, el dendrograma y el análisis de correspondencia contruidos con los datos DRB1 y DQB1 (baja resolución) mantienen agrupados los sub-saharianos y los griegos, confirmando que estas poblaciones poseen un perfil de frecuencias HLA muy similar (Figuras 39 y 40).

## 2.2. Otros marcadores genéticos

La fibrosis quística o mucoviscidosis es una enfermedad autosómica recesiva producida por mutaciones (cambios, deleciones y alteraciones de splicing) en el gen CFTR localizado en el cromosoma 7. Hasta el momento, se han descrito alrededor de 1000 mutaciones en el gen CFTR que se distribuyen de forma diferencial en las poblaciones, siendo algunas de ellas únicas. Una de ellas, 3120+1G→A, es una mutación de splicing que se encuentra en africanos (constituye el 50% del total), afro-americanos, árabes saudíes (que viven en oasis orientales) y en griegos (*Dork y col. 1998*), que son los únicos caucasoides que poseen esta mutación. Además, el estudio de marcadores intra y extragenéticos al CFTR indican que los haplotipos con la mutación 3120+1G→A se encuentran muy conservados en aquellos individuos de las poblaciones mencionadas. Esta similitud se extiende desde 220 Kb anteriores hasta 660 Kb posteriores al gen CFTR; con la salvedad de que los griegos sólo difieren del resto por tener una unidad menos de repetición CA (16 vs 17) en el microsatélite del intrón 8 -IVS8CA- (*Dork y col. 1998*). Estos hallazgos indican que esta mutación tiene un origen común en estas poblaciones y, a pesar de que los griegos son los únicos caucasoides en los que se ha detectado esta mutación, es posible descartar un evento de mutación recurrente en los griegos, dada la distribución geográfica de la mutación y la homología de haplotipos característicos de esta mutación. Por otra parte, existen otras mutaciones compartidas por los griegos y árabes saudíes como una mutación de la señal de poliadenilación en el gen de la  $\alpha$ -globina. La mutación 3120+1G→A parece tener un origen antiguo y podría estar presente en poblaciones norteafricanas y sub-saharianas, en las que aún no hay estudios comparativos.

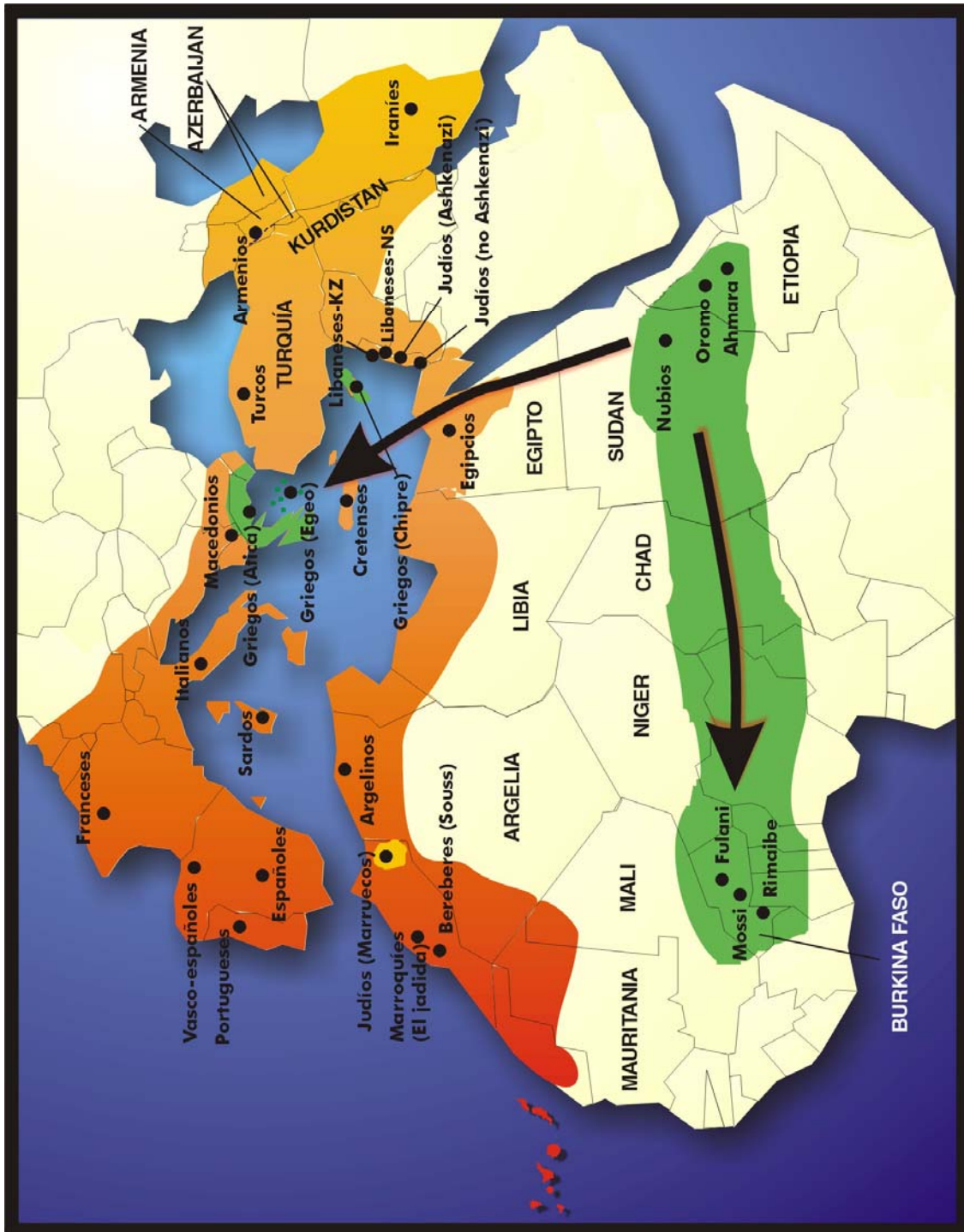
### 2.3. El origen de los griegos

Una vez establecida la estrecha relación genética entre los griegos y los sub-saharianos, queda intentar explicar de qué modo pudo darse el flujo genético entre estas poblaciones:

1) Es posible que el Sahara hamítico densamente poblado (anterior a 6000 aC) estuviera compuesto de una mezcla de poblaciones caucasoides y negroides, y que algunas de estas poblaciones pudieran haber migrado por causas desconocidas hacia Grecia. Esto habría ocurrido cuando se establecieron las condiciones hiperáridas en el Sahara, produciéndose migraciones desde el desierto en todas direcciones (ver Apdo. 4). En este caso, el más antiguo substrato griego de los pelagos podría proceder de una base poblacional negroide.

2) Una explicación más probable es que alguna dinastía negra (y sus seguidores) del Egipto faraónico, de origen etíope, fuera expulsada y se dirigiera a Grecia, mezclándose con las poblaciones autóctonas (Figura 47). De hecho, los antiguos griegos pensaban que sus religión y su cultura provenían de Egipto (*Herodotus 1989, Bernal 1987*). El escritor clásico Esquilo en su obra *Las Suplicantes*, primera y única obra conservada de tres junto con *Los Egipcios* y *Las Danaides*, describe la llegada a Argólida de Danao y de sus 50 hijas, las cuales han huido de Libia para no casarse con los hijos de Egipto. Los recién llegados suplican a Pelasgo, rey de Argos, que les proteja; éste vacila, pero los argivos dan su voto favorable. Cabe deducir que estas 50 mujeres negras, Las Danaides, hijas de Danao (hermano de Egipto, según la mitología) se habrían asentado en Grecia (*Herodotus 1989*). Los estudios realizados hasta el momento en egipcios (escasos y semi-resolutivos) parecen indicar que estos no tienen los alelos HLA-DRB1 característicos de los etíopes y griegos (*Hors et al. 1997*). Por otro lado, los faraones Hyksos y su pueblo fueron expulsados de Egipto y pudieron haber alcanzado Grecia hacia 1540 aC. Sin embargo, se pensaba que los Hyksos provenían del área de la actual Israel y Siria. Otra entrada de genes desde Etiopía (que significa “negros” en griego antiguo) podría haber llegado a través del rey Memmon de Etiopía y sus tropas, quienes ayudaron a los griegos contra los troyanos, de acuerdo a la Iliada de Homero.

Cualquiera que fuera el modo de emigración de etíopes hacia Grecia se puede deducir que no dejaron presencia genética en Creta, puesto que no se observan los alelos característicos en los cretenses, ni son similares sus perfiles genéticos. Una explicación podría ser que la emigración etíope hacia Grecia ocurriera cuando los minoicos poseían un fuerte imperio, que no permitió el asentamiento de poblaciones extranjeras. Por otra parte, los pueblos indoeuropeos pre-micénicos que llegaron a la Península Balcánica (2000 a. C), si es que realmente ocurrió así, debieron encontrarse con poblaciones autóctonas que ya poseían el substrato genético etíope y con las que tuvieron, en principio, una escasa mezcla genética. Las invasiones dóricas y, posteriormente, aqueas sobre Creta fueron realizadas por grupos militares que carecían de este substrato etíope.



**Figura 47.** El movimiento de poblaciones (y genes) etíopes hacia Grecia y África Occidental por el Sahel explicarían las relaciones genéticas existentes entre estas poblaciones (color verde). El resto de poblaciones se muestran relacionadas entre sí.

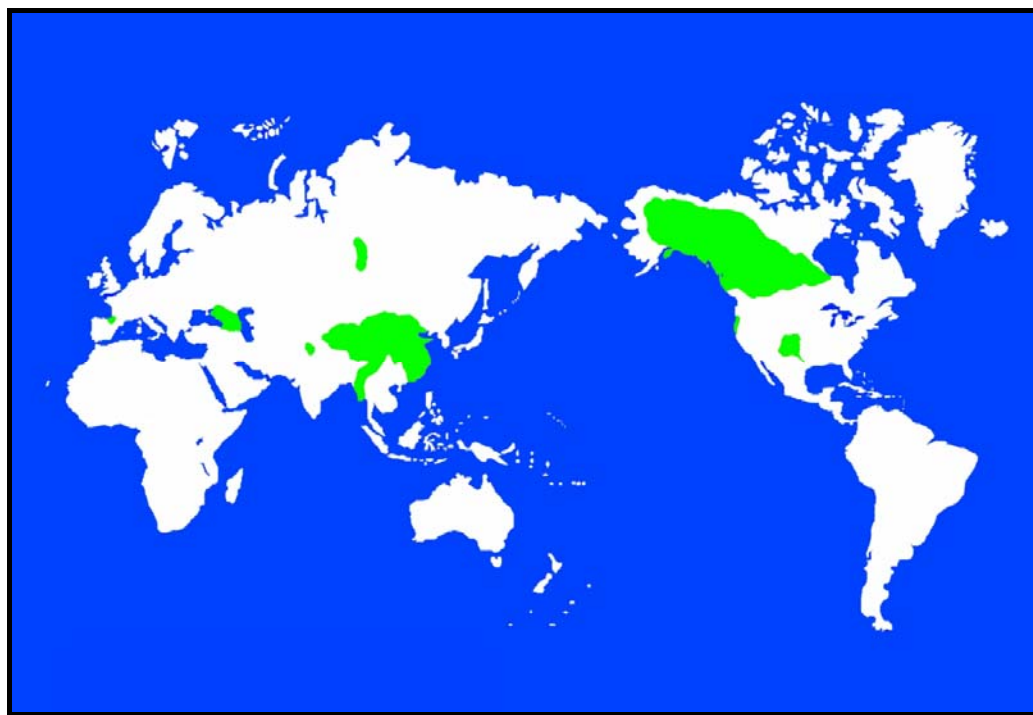
Por otra parte, no se observa relación genética de los griegos con los senegaleses, ni de estos con los africanos occidentales (Fulani, Rimaibe y Mossi) a pesar de la proximidad geográfica; el origen de estas poblaciones negroides occidentales (Fulani, Rimaibe y Mossi) es probablemente etíope, dada su similitud no sólo en ciertos alelos HLA sino en el conjunto de su polimorfismo HLA. Estos y otros grupos que poblaban el Sahara se habrían desplazado a través de una franja subsahariana llamada Sahel (Figura 47).

Los Fulani son cazadores-recolectores; sus características faciales y color de piel presentan cierta mezcla caucasoide. Los Rimaibe fueron esclavos pertenecientes a los Fulani y se mezclaron entre sí. Los Mossi constituyen un grupo con más mezcla étnica (incluyendo a los Fulani) (*Gonem 1996*).

Estudios antropológicos, lingüísticos y culturales sugieren que los Fulani tienen muchas características en común con los antiguos egipcios (*Lam 1996*), indicando quizá un mismo origen en el Sahara antes de su desecación (ver apdo La Hipótesis Sahariana).

### 3. LAS ANTIGUAS LENGUAS USKO-MEDITERRÁNEAS

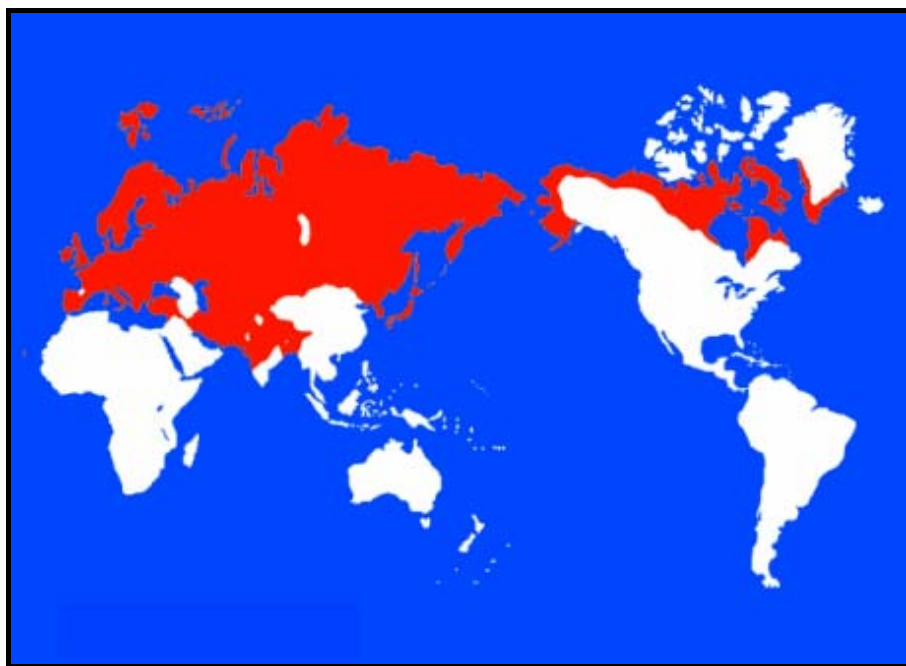
Actualmente, existen 5.000 lenguas vivas. El vasco ha permanecido como un aislado lingüístico, amén de geográfico y genético, y se ha clasificado recientemente dentro de la familia Dene-Caucásico entre los que se encuentran las lenguas Na-Dene, Burushaski, Sino-Tibetano, Yenisei, y Caucásico (*Ruhlen 2000*) (Figura 48).



**Figura 48.** Localización geográfica de la familia lingüística Dene-Caucásico.

Por otra parte, las lenguas extintas como el Lineal A cretense, Ibero-Tartésico (P. Ibérica), Etrusco (Italia), Guanche (Islas Canarias), Copto (Egipto), Sumerio (Irak), Elamita (Irán) y Eblita (Canaan) fueron habladas por las antiguas poblaciones del Mediterráneo, quienes dejaron herencia lingüística y cultural en forma de inscripciones. Estas han sido encontradas principalmente en las cercanías de los antiguos palacios, como el de Cnossos en Creta, pues estos lugares son los que mejor se han conservado a lo largo del tiempo.

A partir del vasco, se han traducido al menos 600 palabras obtenidas de inscripciones de estas antiguas lenguas, estableciendo una correlación entre ellas con el vasco y el Bereber (*Arnaiz-Villena y Alonso-García 1998, 2000, Tabla 23*). La mayoría de las inscripciones encontradas y traducidas



**Figura 49.** Localización geográfica de la familia de lenguas euroasiáticas o indoeuropeas.

hacen referencia a ritos religiosos, a “la puerta” (viaje al más allá), a la purificación del alma, a la “Diosa Madre”; en definitiva a una religión común en todas ellas que denotaba unas costumbres, una cultura definida como pre-neolítica (*Arnaiz-Villena y Alonso-García 1998, 2000*).

El término “Usko” (También “Uska” y “Osco”) aparece frecuentemente en estas inscripciones y puede traducirse desde el vasco como “Us” o “Uts” (puro, sin mezcla) y “Ko” (de los). Por tanto, las lenguas Usko-Mediterráneas fueron las de los puros o poblaciones antiguas no mezcladas. La cultura Usko-Mediterránea fue favorecida y mantenida probablemente por un poderoso y pequeño número de personas (clérigos, militares, etc) que dejaron estas inscripciones en templos y otros lugares.

El bereber, lengua no indoeuropea, se habla actualmente por 20 millones de personas distribuidas a través de Egipto (oasis de Siwa), Libia, Argelia, Túnez, Marruecos, Sahara Occidental,

CASTELLANO	VASCO	IBERO-TARTESICO	ETRUSCO	MINOICO	BERBER	PUNICO-CARTAGINES	HITITA	SUMERIO	EBLITA	ELAMITA	EGIPCIO
PADRE	ABA	ABA	AVA	ABA	ABA	ABA	ABA	ABA	ABA	ABA	ABA
PANEL											
HENDIDURA	AMA	AMA	AMA	AMA	AMA	AMA	AMA	AMA	AMA	AMA	AMA
MADRE (NOMBRE DE LA DIOSA DE LA PUERTA)											
HERMANDAD	ANA	ANA	ANA	ANA	ANA	ANA	ANA	ANA	ANA	ANA	ANA
PIEDRA (SEPULTURA DE PIEDRA)	ARRI	ARRI	ARRI	ARRI	ARRI	ARRI	ARRI	ARRI	ARRI	ARRI	ARRI
BARRANCO (CEMENTERIO)	ARRU	ARRU	ARRU	ARRU	ARRU	ARRU	ARRU	ARRU	ARRU	ARRU	ARRU
NOCHE (OSCURIDAD)	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS
PUERTA (NOMBRE DE LA RELIGIÓN)	ATA	ATA	ATA	ATAN	ATA	ATA	ATA	ATA	ATA	ATA	ATA
REUNIDOS	BATU	BATU			BATU	BATU		BATU			BATI
GUADANA (MUERTE)	DALU	DALA	DALE	DALU	DALU	DALU		DALA	DULA	DEELA	
ARREPENTIMIENTO	DAMU	DAMU	DAMU	DAME	DAMU	DAMU	DAMU	DAMU	DAMU		DAMA
SITIO LUGAR	GUNE	GANI	GUNA	GUNE	GUNE	GANE	GANA	GUNE	GUNE	GUNA	GANA
AUTORIDAD OTORGAR	MAN	MAN	MAN	MAN	NAM	MAN	MAN	MANA	MANA		MEN
LLAMAS	KAR	KAR	KAR	KAR	KAR	KAR	KAR	KAR	KAR		KAR
AGUA	IZ						IZ				
CIELO	ZERU	SERU	SERU	ZERU				ZERU			XERU
VALLE	ABAL	ABAL	AVAL					ABAL			ABAL
SECO	ABAR	ABAR									ABER
DESTINO SUERTE	ABE	ABE	AVE				ABE		ABE		
BESTIA ANIMAL	ABERE	ABARI	AVARI	ABERE							ABERE
NIPO CONCAVIDAD (SEPULTURA)	ABI	ABI	AVI	ABI	ABI	ABI	ABI	ABI	ABI	ABI	ABI
BOCA (SEPULTURA)	ABO	ABO	AVU	ABO		ABO	ABO	ABO		ABU	ABU
OPINION PARECER	ABULI	ABILI						ABULLU			
EN UNA VOZ	ABUN	ABUN	AFUN								ABUN
ADIOS	ADI	ADI	ADI	API				ADI	ADI		ADI
ADIOS	AGUR	EGUR		AGUNA			AGIR	AGUR			
CORRIENTE DE SOLIDO (RIO DE FUEGO)	AI	AI	AI	AI		AI	AI	AI			AI
PADRE	AITA	AITE						AITA			AITA
MUERTO ACABADO	AKA	AKA	AKA	AKA		AKA	AKA	AKA	AKA	AKA	AKA
MIRADA	AKU	AKU	AKU	AKU	AKU						
	(V. IKUSI)										

**Tabla 23.** Algunas palabras de las diferentes lenguas que pertenecen al grupo Usko-Mediterráneo (relacionado con el Dene-Caucásico) y su traducción al castellano (Arnaiz-Villena y Alonso-García 1999, 2000).

Mauritania, Mali, Níger y Chad (*Rachid Raha 1994*). Estos pueblos hablan la lengua *Tamazight*, nombre que engloba todos los dialectos del bereber utilizados por estos pueblos (*Imazighen*). La lengua proto-bereber se vio influenciada en gran medida por el árabe durante su invasión norteafricana aunque repercutió en mucha menor medida en la mezcla de genes (*Gomez-Casado y col. 2000*). Este hecho y el relativo aislamiento que han sufrido los grupos de habla bereber podrían explicar el gran número de dialectos actuales.

El bereber con todos sus dialectos actuales (*Tamazight*), el vasco y las demás lenguas extintas del antiguo Mediterráneo se consideran lenguas Usko-Mediterráneas. Estas fueron remplazadas (salvo el vasco y el bereber) por las euroasiáticas o indoeuropeas (Figura 49) alrededor de 2000 a. C. debido a causas desconocidas. La llegada a los Balcanes de los primeros griegos pre-micénicos (alrededor de 1450 a. C.), la destrucción del imperio cretense y su posterior expansión, fuera quizá el comienzo de este proceso de reemplazamiento de lenguas en Creta. A lo largo del tiempo todas las lenguas euroasiáticas han mantenido hasta hoy palabras Usko-Mediterráneas (*Arnaiz-Villena y Alonso-García 2000*).

## 4. LA HIPÓTESIS SAHARIANA

### 4.1 África: cambios climáticos y expansión sahariana

Alrededor de los años 8000-4000 a. C., después del último máximo glacial, el norte de África comenzó a sufrir cambios climáticos drásticos, convirtiéndose en una región más calurosa y seca. Como consecuencia se fue desplazando la “Línea de la Selva” desde el paralelo 16 hacia el Ecuador (3000 a. C.) (Figura 50A) (*Bodmer y Cavalli-Sforza 1976*).

Este hecho histórico fue revelado científicamente por la lanzadera espacial Columbia, que recopiló multitud de fotografías por infrarrojo (*McCauley y col. 1982*); lo que hoy es la vasta y árida superficie del desierto del Sahara fue en otro tiempo una rica y fértil tierra con gran cantidad de ríos, lagos y vegetación. La desecación de esta superficie (8.600.000 Km<sup>2</sup>, similar a los Estados Unidos) debió suponer unas condiciones de vida cada vez más extremas para la flora, la fauna y los pueblos que allí habitaban.

Las poblaciones saharianas debieron de adquirir conocimientos sobre agricultura, domesticación de animales y de navegación, avanzando en estos y otros conocimientos a medida que las condiciones climáticas hacían cada vez más extremas las condiciones de vida en esas regiones, hasta que se vieron obligados a migrar (de forma paulatina) a zonas más húmedas y habitables. El espectro poblacional africano se ha clasificado (alrededor de 7000-3000 a. C.) en cinco grupos principales (*McEvedy y Jones 1978*) (Figura 50B):

- 1- Hamitas, pueblos de tez blanca y lengua hamita que habitaron las costas del Mediterráneo y el Mar Rojo. Posteriormente, se subdividieron en bereberes y egipcios (n=100.000), y etíopes



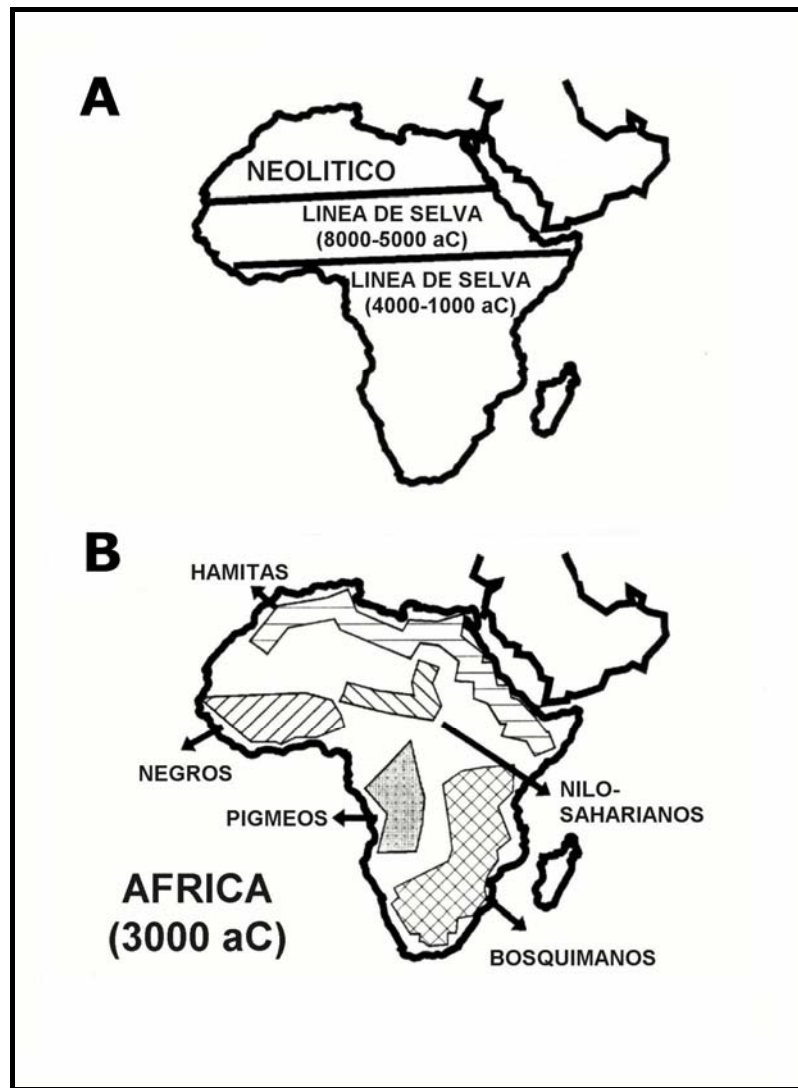
blancos y negros (n=100.000).

2- Negroides del Golfo de Guinea (n=250.000).

3- Negroides Nilo-Saharianos (n=250.000), que actualmente habitan el desierto del Sahara y las orillas del río Nilo.

4- Negroides Pigmeos de la costa sudoeste africana (n=200.000).

5- Negroides bosquimanos (San) de la costa sur y sudeste africana (n=350.000).



**Figura 50.** (A) Desplazamiento de la línea de selva entre 8000 y 1000 a.C. (B) Grupos étnicos en África en 3000 a. C.

La expansión multidireccional de pueblos hamitas implicó el movimiento de genes y de las lenguas (Figura 51) desde el Sahara hacia el noroeste (islas Canarias), norte (Península Ibérica y norte de África), noreste (Egipto, Creta, Macedonia, Anatolia, Líbano e Israel, Irán y Armenia), surgiendo quizá de esta última la población que alcanzó la isla de Creta. Este hecho principalmente, ayudado por los contactos entre mediterráneos, explicaría las similitudes genéticas y lingüísticas observadas

---

entre estas poblaciones.

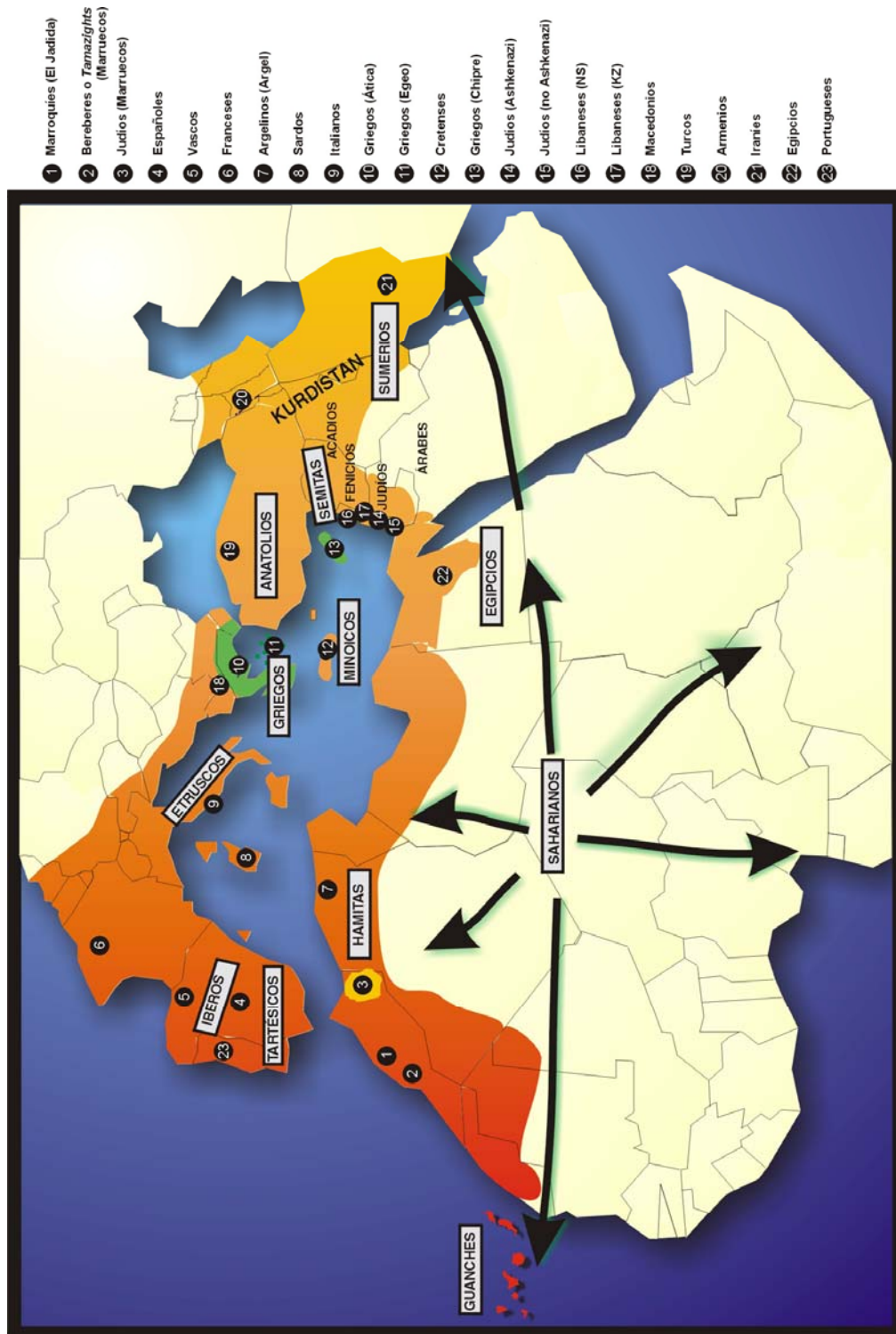
Es aventurado suponer en qué fecha comenzaron las distintas migraciones desde el Sahara, que pudieron ocurrir de forma paulatina hasta el sexto milenio, en el que se producirían movimientos masivos de población según se deduce de las culturas africanas de la Península Ibérica, la aparición de las cuevas de Sicilia y la colonización de Creta. Muchas de las rutas seguidas debieron ser por tierra, pero también fueron marítimas (Estrecho de Gibraltar, sur y norte de Italia, Cerdeña, Creta, Macedonia) porque tenían conocimientos de navegación, adquiridos supuestamente en los grandes lagos africanos. De hecho, se han encontrado dibujos rupestres en el Sahara de embarcaciones con un mástil central y muchos remeros, que en un principio se consideraron una imitación a los del Nilo, ya que estos dibujos son iguales a los representados en los vasos funerarios egipcios.

Una de las vías de emigración más estudiadas es la que concierne a la Península Ibérica a través del Estrecho de Gibraltar; algunos autores indican que el hombre paleolítico lo habría cruzado con facilidad (ver Tabla 20). Pero es, probablemente, entre el 6°-4° milenio cuando se produce una entrada de norteafricanos-hamitas neolíticos (Tabla 20) que aportan parte del substrato genético HLA actual en los portugueses, españoles y vascos. Este hecho se ve apoyado por los datos genéticos HLA y no HLA (DNA mitocondrial -mtDNA- y cromosoma Y), antropológicos y lingüísticos entre los vascos, íberos y norteafricanos bereberes argelinos y marroquíes.

Otra de las vías de emigración fue hacia el oeste; la colonización de las islas Canarias dio lugar a los guanches. Los mtDNA canarios actuales presentan polimorfismos de origen bereber (*Pinto y col. 1996*), amén de inscripciones con textos Usko-Mediterráneos (Guanche) (*Arnaiiz-Villena y Alonso-García 2000, 2001d*).

La llegada a Cerdeña (antiguos sardos) se refleja en los genes HLA actuales mediante el haplotipo A30-B18-DR3, característico de argelinos, vascos, españoles y marroquíes. Por otra parte el haplotipo A30-B13-DR7 establece un vínculo común entre marroquíes bereberes, españoles, judíos, ligures (Pavía, Norte de Italia), cretenses y otros mediterráneos orientales, donde también llegaron los emigrantes norteafricanos (hamitas).

El movimiento poblacional hacia el Este encontró en el delta del Nilo un lugar favorable para establecerse y prosperar. Uno de los últimos reductos de habla bereber se encuentra en el oasis de Siwa (Egipto), cuyos habitantes actuales comparten el haplotipo específico HLA-DRB1\*0405-DQB1\*02 (DR4-DQ2) con los cretenses y turcos. De ahí, probablemente continuó la progresión sahariana al este por la vía palestina, presumiblemente poblada por gentes con las mismas creencias y lenguas, y las mismas dificultades para sobrevivir debido a la sequía. La relación actual entre los genes HLA y las lenguas (Usko-Mediterráneas) de los iraníes, libaneses, turcos, cretenses, bereberes e íberos, hace pensar que el avance poblacional seguiría por Asia Menor hasta alcanzar incluso el Cáucaso.



**Figura 51.** Poblaciones y lenguas Usko-Mediterráneas (extintas salvo el vasco y el bereber ) establecidas tras la expansión poblacional según la hipótesis sahariana.

## 4.2. La hipótesis sahariana frente al modelo de difusión démica

Hasta el momento, se aceptaba de forma general el clásico modelo de difusión démica postulado por Gimbutas (1963) y Renfrew (1987) para explicar la expansión, de Este a Oeste de Europa, de poblaciones neolíticas que habrían remplazado las mesolíticas existentes. Así, la agricultura europea se habría establecido con la desaparición de los cazadores-recolectores mesolíticos. Este modelo ha sido utilizado para interpretar las diferencias de frecuencias de los grupos sanguíneos de poblaciones europeas, y estas coincidirían con la cronología del modelo de expansión del neolítico desde Oriente Medio hasta la Península Ibérica (*Ammerman y Cavalli-Sforza 1984*). Sin embargo, un importante conjunto de datos con relación a la Península Ibérica, al norte de África y a otras regiones del Mediterráneo apoyan a la hipótesis sahariana (Figura 51) como modelo de transición al neolítico de las poblaciones mediterráneas. Estos datos se resumen en los siguientes puntos:

1) El estudio de ocho variables craneométricas realizado con esqueletos mesolíticos y neolíticos pertenecientes a España y Portugal no muestra ningún cambio entre ellos (*Meiklejohn y col. 1984; Lubell y col. 1994; Lalueza-Fox 1996; Jackes y col. 1997*). Autores con estudios diferentes (*Lalueza-Fox 1996; Jackes y col. 1997*) convergen en la conclusión de que no existen diferencias de estatura en los esqueletos mesolíticos y neolíticos, cuando deberían ser de mayor estatura estos últimos (*Meiklejohn y col. 1984*). Además, se observa un similar grado de caries dentales en ambos tipos de esqueletos, debido a que los cambios alimentarios ya se produjeron en el mesolítico y se continuaron en el neolítico (*Lubell y col. 1994*).

2) Estudios arqueológicos llevados a cabo en la desembocadura del río Guadalquivir (la Marismilla, Sevilla) han mostrado que los bóvidos y gatos llegaron con los pueblos de África hace alrededor de 5000 años (*Escacena-Carrasco 1996*). Además, la cultura egipcia pre-dinástica “El-Badari” (hace 4500 años) es similar, con relación a la domesticación de animales y cerámica, a la encontrada en muchos asentamientos neolíticos del sur de la península Ibérica. La cerámica cardial es común en Europa occidental y costas norteafricanas. La distribución costera de esta cerámica cardial es evidencia de contactos mediterráneos frecuentes. Además, las pinturas encontradas en la cueva de Tassili (sur de Argelia) en mitad del Sahara muestran bóvidos domesticados, datados aproximadamente de 1000 años antes de las primeras prácticas agrícolas neolíticas documentadas del Este.

3) Los resultados genéticos HLA presentados en esta tesis doctoral evidencian la existencia de flujo genético de los paleo-norteafricanos a la península Ibérica (vascos, españoles, portugueses) y a poblaciones mediterráneas orientales (cretenses, macedonios, judíos, libaneses, egipcios, turcos, iraníes).

Por otra parte, estudios recientes sobre el polimorfismo del mtDNA han evidenciado que la

---

entrada de genes desde el norte de África en la Península Ibérica fue tan importante como los procedentes del resto de Europa. Además, revelan que la expansión poblacional paleolítica desde el sudoeste de Europa (zona atlántica) podría haber ocurrido desde hace 10.000-15.000 años, después del último máximo glacial. El haplogrupo V, un marcador mtDNA, explicaría esta expansión ya que se ha observado en norte de África y noroeste de Europa, alcanzando frecuencias elevadas en los bereberes, en la Península Ibérica y en los sardos. El haplogrupo V, al contrario que el haplogrupo H, no surgió en oriente próximo sino en Europa o norte de África. Además, la mayoría de los genes mitocondriales encontrados actualmente en las islas Canarias corresponden a sus primeros pobladores, los Guanches de origen bereber (*Pinto y col. 1996*).

Estudios del polimorfismo del cromosoma Y apoya un origen común paleo norteafricano para los vascos y sardos (*Santachiara-Benerecetti y Semino 1996*).

4) La existencia de un grupo común de lenguas Usko-Mediterráneas antiguas (Lineal A, Etrusco, Ibero-Tartésico, Guanche, Copto, Sumerio, Eblita, Elamita, etc) cuya traducción ha sido posible a partir del vasco (*Arnaiz-Villena y Alonso-García 2000*).

Finalmente, la aparición de pueblos indoeuropeos con herramientas más agresivas, como los griegos pre-micénicos (y otros invasores), conduciría al reemplazamiento de lenguas y creencias religiosas. Sin embargo, no se produjo un intercambio genético tan importante como para diluir el antiguo sustrato hamita-mediterráneo HLA, del cual hoy somos herederos en parte. Gracias a los restos arqueológicos, lingüísticos y al estudio del Sistema HLA, hoy se puede replantear el origen de la antigua cultura Mediterránea. Los datos genéticos HLA presentados en esta tesis doctoral sustentados por los antropológicos y lingüísticos convergen en definir a los griegos como mediterráneos más recientes, que se habrían aprovechado de la cultura cretense más avanzada y antigua para prosperar y transmitir al mundo actual parte de los antiguos conocimientos de los Mediterráneos.

# **CONCLUSIONES**

1. Los cretenses y macedonios poseen una composición HLA muy similar entre sí, y con respecto al resto de los mediterráneos orientales (judíos y libaneses) y occidentales, tanto europeos como norteafricanos (íberos, marroquíes y argelinos).
2. Los turcos, egipcios, iraníes y armenios también presentan una composición HLA similar a los cretenses, macedonios y otros antiguos mediterráneos.
3. La población cretense presenta de forma específica el haplotipo extendido HLA-A\*02-B\*13-DRB1\*1601-DQA1\*0102-DQB1\*0502; este puede ser la herencia de los antiguos minoicos o haber surgido tras la mezcla genética de estos con invasores de la isla de Creta.
4. Los macedonios tienen entre los más frecuentes dos haplotipos extendidos específicos: HLA-A\*02-B\*51-DRB1\*1601-DQB1\*0502 y HLA-A\*03-B\*18-DRB1\*1601-DQB1\*0502.
5. El haplotipo HLA-DR4-DQ2 (DRB1\*0405-DQB1\*02) es específico de los cretenses, egipcios y turcos, probablemente debido a contactos desde al menos los tiempos minoicos.
6. Los griegos (de Ática, de las islas del Egeo, y Chipre) no están relacionados genéticamente con los cretenses, macedonios, ni con otros mediterráneos orientales u occidentales comparados (estudios de distancias genéticas, dendrogramas, análisis de correspondencia).
7. Los griegos poseen un fuerte substrato etíope/sub-sahariano, como ponen de manifiesto los alelos casi-específicos HLA-DRB1 compartidos y las distancias genéticas, dendrogramas y análisis de correspondencia obtenidos con datos HLA-DR de alta y baja resolución.
8. Una posible hipótesis para explicar el flujo de genes típicos de negroides sub-saharianos y etíopes a la que es hoy Grecia, puede basarse en la expulsión de etíopes de Egipto y de sus faraones negros. Este hecho apoyaría la inmigración masiva al Peloponeso, descrita por Esquilo en su obra “Las suplicantes”, de las egipcias Danaides (negras) y la creencia recogida por escritores griegos clásicos como Herodoto de que la cultura griega provenía de Egipto.

9. Los antiguos mediterráneos compartirían, además de la genética, unas lenguas similares llamadas Usko-Mediterráneas: íbero-tartésico (Península Ibérica), Guanche (Islas Canarias), etrusco (Italia), el Lineal A minoico (Creta), copto (Egipto), sumerio (Irak), elamita (Irán) y eblita (Canaan), y el actual vasco y bereber. También la lingüística establece que los griegos no hablaban una lengua Usko-Mediterránea; tomarían la escritura del Lineal A cretense para escribir su idioma y lo convertirían en el Lineal B.
  
10. Los datos genéticos HLA presentados sustentados por los antropológicos y lingüísticos indicarían que los griegos habrían aprovechado la antigua cultura Usko-Mediterránea de los cretenses y otros mediterráneos antiguos para sentar las bases de su propia cultura y, por tanto, de la actual cultura occidental.
  
11. El modelo de relaciones genéticas y lingüísticas no es concordante con la sustitución poblacional de los cazadores-recolectores europeos por los agricultores procedentes de Oriente Medio. La hipótesis más factible es que el flujo cultural y genético por mar (circum-mediterráneo) es el responsable de la adquisición de elementos culturales y genéticos comunes, entre ellos las tecnologías agrícolas.
  
12. Asimismo, las relaciones filogenéticas HLA entre los antiguos mediterráneos, las manifestaciones culturales, creencias religiosas y las lenguas Usko-Mediterráneas comunes, podrían explicarse mediante la hipótesis Sahariana. Los bereberes, íberos, judíos, libaneses, cretenses y otros mediterráneos podrían ser, en parte, los descendientes de estas poblaciones saharianas que se verían forzadas a abandonar su tierra después que se establecieran las condiciones superáridas (5000 a. C.).



# **BIBLIOGRAFÍA**

## A

- Albertson DG**, Fishpool R, Sherrington P, Nacheva E, y Milstein C. *Sensitive and high resolution in situ hybridization to human Crs. using biotin labelled probes: assignment of the human thymocyte CD1 antigen genes to Cr 1*. *Embo J* 7: 2801-2805, 1988.
- Alonso-García J**. *Desciframiento de la lengua Ibérico-Tartésica*. Barcelona: Tartesos, 1996.
- Ammerman AJ**, y Cavalli-Sforza LL. *The Neolithic transition and the genetics of populations in Europe*. Princenton: Princenton University Press, 1984.
- Arguello R**, Avakian H, Goldman JM, y Madrigal JA. *A novel method for simultaneous high resolution identification of HLA-A, HLA-B, and HLA-Cw alleles*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10961-10965, 1996.
- Arnaiz-Villena A**, Rodriguez de Córdoba S, Vela F, Pascual JC, Cerveró J, y Bootello A. *HLA antigens in a sample of the Spanish population: common features among Spaniards, Basques, and Sardinians*. *Hum Genet* 57: 317-321, 1981.
- Arnaiz-Villena A**, Benmamar D, Alvarez M, Díaz-Campos N, Varela P, Gómez-Casado E, y Martínez-Laso J. *HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. Relatedness to Spaniards and Basques*. *Hum Immunol* 43: 259-268, 1995.
- Arnaiz-Villena A**, Martínez-Laso J, Gómez-Casado E, Díaz-Campos N, Santos P, Martinho A, y Breda-Coimbra E. *Relatedness among Basque, Portuguese, Spaniards and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes*. *Immunogenetics* 47: 37-43, 1997.
- Arnaiz-Villena A**, y Alonso-García J. *El origen de los vascos y otros pueblos mediterráneos*. Madrid: Editorial Complutense, 1998.
- Arnaiz-Villena A**, y Alonso-García J. *Minoicos, Cretenses y Vascos*. 2ª Edición. Madrid: Editorial Complutense, 1999.
- Arnaiz-Villena A**, y Alonso-García J. *The Usko-Mediterranean languages*. En: *Prehistoric Iberia: Genetics, Anthropology and Linguistics*. Arnaiz-Villena A (ed). Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.
- Arnaiz-Villena A**, Dimitrovsky I, Pacho A, Moscoso J, Gomez-Casado E, Silvera-Redondo C, Varea P, Blagoevska M, Zdravkovska V, Martinez-Laso J. *HLA genes in Macedonians and the sub-Saharan origin of the Greeks*. *Tissue Antigens* 51: 118-127, 2001a.
- Arnaiz-Villena A**, Karin M, Bendikuz N, Gomez-Casado E, Moscoso J, Silvera C, Oguz FS, Sarper Diler A, De Pacho A, Allende L, Guillen J, Martinez Laso J. *HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans*. *Tissue Antigens* 57: 308-317, 2001b.
- Arnaiz-Villena A**, y Alonso-García J. *Caucásicos, Turcos, Mesopotámicos y Vascos*. Madrid: Editorial Complutense, 2001c.
- Arnaiz-Villena A**, y Alonso-García J. *Egipcios, Bereberes, Guanches y Vascos*. 2ª Edición. Madrid: Editorial Complutense, 2001d.
- Arnett KL**, y Parham P. *HLA class I nucleotide sequences, 1995*. *Tissue Antigens* 45: 217-257, 1995.

## B

- Barber LA**, y Parham P. *Peptide binding to major histocompatibility complex molecules*. *Ann Rev Cell Biol* 9:163-206, 1993.
- Beckman EB**, Porcelli SA, Furlong S, Morita CT, Behar S, y Brenner MB. *Recognition of a lipid antigen by CD1 restricted alpha beta+ T cells*. *Nature* 372: 891-894, 1994.
- Belich MP**, Glynn RJ, Senger G, Sheer A, y Trowsdale J. *Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins*. *Curr Biol* 4: 769-776, 1994.
- Bernal M**. *Black Athena: the afroasiatic roots of classical civilization*. London: Free Association Books, New Brunswick, Rutgers University Press, 1987.
- Bignon JD**, y Fernandez-Viña MA. *Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP)*. En: *Genetic diversity of HLA Functional and Medical implications*. Charron D (ed). Vol 1. EDK, Paris, pp 584-595, 1997.
- Bjorkman PJ**, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, y Wiley DC. *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. *Nature* 329: 506-512, 1987a.
- Bjorkman PJ**, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, y Wiley DC. *The foreign antigen binding site and T cell recognition region by class I histocompatibility antigens*. *Nature* 329: 512-518, 1987b.
- Blanchet O**, Bourge JF, Zinszner H, Israel A, Kourilsky P, Dausset J, Degos L, y Paul P. *Altered binding of regulatory factors to HLA class I sequence in*

- human tumor cell lines lacking class I expression.* Proc Natl Acad Sci USA 89: 2488-2492, 1992.
- Bodmer JG**, Marsh SGE, Albert E, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GMY, Strominger JL, Svejgaard A, y Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. Tissue Antigens 46: 1-18, 1995.
- Bodmer JG**, Marsh S, Albert E, Bodmer W, Bontrop R, Charron D, Dupont B, Erlich H, Fauchet R, Mach B, Mayr W, Parham P, Sasazuki T, Schreuder Th, Strominger J, Svejgaard A, y Terasaki P. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. En: *Genetic diversity of HLA Functional and Medical implications*. Charron D (ed). Vol 2. EDK, Paris, pp 505-532, 1997a.
- Bodmer JG**, Cambon-Thomsen J, Hors J, Piazza A, y Sánchez-Mazas A. *Anthropology report introduction*. En: *Genetic diversity of HLA Functional and Medical implications*. Charron D (ed). Vol 2. EDK, Paris, pp 269-284, 1997b
- Bodmer WF**, y Cavalli-Sforza LL. *Genetics, Evolution, and Man*. San Francisco: WH Freeman, p 573, 1976.
- Bonné-Tamir B**, Bodmer JG, Bodmer W, Pickbourne P, y Brautbar C. *HLA polymorphism in Israel. An overall comparative analysis*. Tissue Antigens 11: 235-250, 1978.
- Borrego F**, Ulbrecht M, Weiss E, Coligan JE, y Brooks AG. *Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen HLA-E complexed with HLA class I signal sequence derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from Natural Killer cell mediated lysis*. J Exp Med 187: 813-818, 1998.
- Braud VM**, Jones EY, y McMichael AJ. *The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9*. Eur J Immunol 27: 1164-1169, 1997a.
- Braud VM**, Allan DSJ, Wilson D, y McMichael AJ. *TAP and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlated with the binding of an MHC class I leader peptide*. Curr Biol 8: 1-10, 1997b.
- Braud VM**, Allan DSJ, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, y McMichael AJ. *HLA-E binds to natural killer cells receptors CD94/NKG2A, B and C*. Nature 391: 795-799, 1998.
- Brautbar C**, Friedmann A, Battat S, Tambur R, Cambon-Thomsen A, Ohayon E, Tongio M, Dupont E, y Essakali-Gharbi M. *HLA in Israeli Jews, Moroccans and Algerians*. En: *HLA 1991*. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds). Vol I, Oxford: Oxford University Press, Oxford, pp 656-658, 1992.
- Brega A**, Scacchi R, Cuccia M, Kirdar B, Peloso G, y Corbo RM. *Study of 15 protein polymorphisms in a sample of the Turkish population*. Hum Biol 70: 715-728, 1998.
- Brown JH**, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, y Wiley DC. *The three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1*. Nature 364: 33-39, 1993.
- Burillo-Mozola F**. *Los Celtíberos*. Barcelona: Ed. Crítica, Grijalbo-Mondadori, 1998.
- Burmeister WP**, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, y Bjorkman PJ. *The 2.2A resolution crystal structure of the MHC-related neonatal Fc receptor*. Nature 372: 336-343, 1994.

## C

**Calabi F**, y Milstein C. *A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to Cr.6*. Nature 323: 540-543, 1986.

**Camarota G**, Sheirre A, Takacs B, Doran DM, Knorr R, Bannwarth W, Guardiola J, y Sinigaglia F. *Identification of a CD4 binding site on the  $\beta 2$  domain of HLA-DR molecules*. Nature 356: 799-801, 1992.

**Campbell RD**, y Trowsdale J. *A map of the human major histocompatibility complex*. Immunol Today 19, 1997.

**Carreno BM**, Solheim JC, Harris M, Stroynowski I, Connolly JM, y Hansen TH. *TAP associated with a unique class I conformation, whereas calnexin associated with multiple class I form in mouse and men*. J Immunol 155: 4726-4733, 1995.

**Cepellini R**, Curtioni ES, Mattiuz PL, Miggiano V, Scudeller G, y Serra A. *Genetics of leukocyte antigens. A family study of segregation and linkage*. En: *Histocompatibility Testing 1967*. Curtioni ES, Mattiuz PL, Tosi RM (eds). Munksgaard, Copenhagen, 149-187, 1967.

**Cereb N**, Kong Y, Lee S, Maye P, y Yang SY. *Nucleotide sequences of MHC class I introns 1, 2 and 3 in humans and intron 2 in nonhuman primates*. Tissue Antigens 47: 498-511, 1996.

**Chang CH**, Fontes JD Peterlin BM, y Flavell RA. *Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes*. J Exp Med 180: 1367-1374, 1994.

**Chang CH**, y Flavell RA. *Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation*. J Exp Med 182: 765-767, 1995.

**Chicz RM**, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DAA, y Strominger JL. *Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size*. Nature 358: 764-768, 1992.

**Ciechanover A**. *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway*. Cell 79: 13-21, 1994.

**Clayton J**, y Lonjou C. *Allele and haplotype frequencies for HLA loci in various ethnic groups*. En: *Genetic diversity of HLA Functional and Medical implications*. Charron D (ed). Vol I, Paris: EDK, pp 665-820, 1997.

**Collins EJ**, Garboczi DN, Karpusas MN, y Wiley DC. *The three-dimensional structure of a class I major histocompatibility complex molecule missing the  $\alpha 3$  domain-molecules*. Proc Natl Acad Sci USA 92: 1218-1221, 1995.

**Connolly JM**, Hansen TH, Ingold AL, y Potter TA. *Recognition by CD8 on cytotoxic T lymphocytes is ablated by several substitutions in the class I  $\alpha 3$  domain: CD8 and T-cell receptor recognize the same class I molecule*. Proc Natl Acad Sci USA 87: 2137-2141, 1990.

**Cotterel A**. *The encyclopaedia of ancient civilizations*. London: Editorial Rainbird, 1980.

**Cresswell P**. *Assembly, transport and function of MHC class II molecules*. Annu Rev Immunol 12: 259-293, 1994.

## D

**Danilovs J**, Terasaki PI, Park MS y Ayoub G. *B-lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool*. En: *Histocompatibility Testing 1980*. Terasaki PI (ed). Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, pp 287-288, 1980.

**Dausset J**, y Colombani J. *Histocompatibility Testing 1970*. Terasaki PI (ed). Munksgaard, Copenhagen, 1972.

**Degos L** y Dausset J. *Human migrations and linkage disequilibrium of HLA system*. Immunogenetics 1: 195-210, 1974.

**Denzin LK**, y Cresswell P. *HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading*. Cell 82: 155-165, 1995.

**Dork T**, El-Harith EHA, Stuhmann M, Macek M, Egan M, Cutting GR, Tzetis M, Kanavakis E, Carles S, Claustres M, Padoa C, Ramsay M, Schmidtke J. *Evidence for a common ethnic origin of cystic fibrosis mutation 3120to-A in diverse populations*. Am J Hum Gene. 63: 656-662, 1998.

## E

**Efron B**. *The jackknife, the bootstrap, and other resampling plans*. CBMS-NSF. Regional conference series in mathematics. N° 38. Society for industrial and applied mathematics, Philadelphia, PA, 1982.

**Escacena-Carrasco JL**. *Guadalquivir salobre*. Sevilla: C. Hidrográfica del Guadalquivir, 1996.

**Excoffier L**, y Slatkin M. *Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population*. Mol Biol Evol 12: 921-927, 1995.

## F

**Falk K**, Röttschke O, Stevanovic S, Jung G, y Rammensee HG. *Allele-specific motifs revealed sequencing of self-proteins eluted from MHC molecules*. Nature 351: 290-296, 1991.

**Faure P**. *La vida cotidiana en la Creta Minoica*. Barcelona: Argos Vergara, 1984.

**Feder J N**, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishain F, Domingo R, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, y col. *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet 13: 399-408, 1996.

**Felsenstein J**. *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap*. Evolution 39: 783-791, 1985.

**Ferrando P**, San Román C, Rodríguez de Córdoba S, y Arnaiz-Villena A. *Partial trisomy 6P: 46 XX, -10, der (10), T (6; 10) (p22; q26) pat and HLA localization*. J Med Genet 18: 231-234, 1981.

**Früh K**, Gossen M, Wang KN, Bujard H, Peterson PA, y Yang Y. *Displacement of house keeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs. A newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex*. Embo J 13: 3236-3244, 1994.

**Fujii T**, Ishitani A, y Geraghty DE. *A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4*. J Immunol 153: 5516-5524, 1994.

## G

- Gaczynska M**, Rock KL, Spies T, y Golberg AL. *Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP-2 and LMP-7*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9213-9217, 1994.
- Garboczi DN**, Ghosh P, Utz U, Fan QR, y Biddison WE. *Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2*. Nature 384: 134-141, 1996.
- García-Bellido A**. *Iberos y Celtas; La península Ibérica en los comienzos de su historia*. Madrid: Itsmo, pp 45-49, 1985.
- Garrett TPL**, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, y Wiley DC. *Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68*. Nature 342: 692-696, 1989.
- Geraghty DE**, Koller BH, y Orr HT. *A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment*. Proc Natl Acad Sci USA 84: 9145-9149, 1987.
- Geraghty DE**, Wei X, Orr TH, y Koller BH. *Human leukocyte antigen F (HLA-F): An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive elements*. J Exp Med 171: 1-18, 1990.
- Geraghty DE**, Koller BH, Hansen JA, y Orr HT. *The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments*. J Immunol 149: 1934-1946, 1992a.
- Geraghty DE**, Koller BH, Pei J, y Hansen JA. *Examination of four HLA class I pseudogenes: common events in the evolution of HLA genes and pseudogenes*. J Immunol 149: 1947-1956, 1992b.
- Ghosh P**, Amaya M, Mellins E, y Wiley AC. *The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3*. Nature 378: 457-462, 1995.
- Gimbutas M**. *The Balts*. New York: Praeger, 1963.
- Glynne R**, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, y Trowsdale J. *A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC*. Nature 353: 357-360, 1991.
- Gobin SJ**, Peijnenburg A, van Eggermond M, van Zutphen M, van den Berg, y van den Elsen. *The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes*. Immunity 9: 531-541, 1998.
- Goldberg AL**, y Rock KL. *Proteolysis, proteasomes and antigen presentation*. Nature 357: 375-379, 1992.
- Gómez-Casado E**, Vargas-Alarcón G, Martínez-Laso J, Perez-Blas M, Granados J, Layrisse Z, Montoya F, Varela P, y Arnaiz-Villena A. *Generation of the HLA-B35, -B5, -B16, and -B15 groups of alleles studied by intron 1 and 2 sequence analysis*. Immunogenetics 46: 469-476, 1997.
- Gómez-Casado E**, Vargas-Alarcón G, Martínez-Laso J, Granados J, Varela P, Alegre R, Longás J, González-Hevilla M, Martín-Villa JM, y Arnaiz-Villena A. *Evolutionary relationships between HLA-B alleles as indicated by an analysis of intron sequences*. Tissue Antigens 53: 153-160, 1999.
- Gómez-Casado E**, Del Moral P, Martínez-Laso J, García-Gómez A, Allende L, Silvera-Redondo C, Longas J, González-Hevilla M, y Arnaiz-Villena A. *HLA genes in Arab-speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians*. Tissue Antigens 55: 239-249, 2000.
- Gonem A**. *The Encyclopedia of the Peoples of the World*. Israel: Jerusalem Publishing House Ltd., pp 143-145, 1996.
- Groettrup M**, Ruppert T, Kuehn L, Seeger M, Standera S, Koszinowski U, y Kloetzel PM. *The interferon- $\gamma$  inducible I1S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20S proteasome in vitro*. J Biol Chem 270: 23808-23815, 1995.
- Groettrup M**, Soza A, Kuckelkorn U, y Kloetzel PM. *Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency*. Immunol Today 17: 429-435, 1996.
- Guillaudeux T**, Rodriguez AM, Girr M, Mallet U, Ellis SA, Sargent IL, Fauchet R, Alsat E, y Le bouteiller P. *Methylation status and transcriptional expression of the MHC class I loci in human trophoblast cells from term placenta*. J Immunol 154: 3283-3299, 1995.

## H

- Hägg R**. *El imperio marítimo de los cretenses*. Mundo Científico 6: 244-252, 1986.
- Hasagawa SL**, y Boss JM. *Two distinct B cell factors bind the HLA-DRA X box region and recognize different subsets of MHC class II promoters*. Nucleic Acids Res 19: 6269-6276, 1991.
- Hashimoto K**, Hirai M, y Kurosawa Y. *A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes*. Science 269: 693-695, 1995.

**Herodotus.** *History*. Madrid: Ed. Gredos, 1989.

**Hiller C**, Bischoff M, Schmidt A, Bender K. *Analysis of the HLA-ABC linkage disequilibrium: decreasing strength of gametic association with increasing map distance*. Hum Genet 41: 301-312, 1978.

**Hors J**, El Chenawi F, Djoulah S, Hafez M, Abbas F, El Borai MH, Kamel M, Abbal M, Cambon-Thomsen A, Mercier P, Revirion D, Magzoub MA, Rosner G, Delgado JC, Yunis E, Raffoux C, Tamouza R, Izaabel H, Hmida S, Benhamamouch S, Bessaoud K, Langaney A, y Sanchez-Mazas A. *HLA in North African populations: 12th International Histocompatibility Workshop NAFR report*. En: *Genetic diversity of HLA Functional and Medical implications*. Charron D (ed). Vol I, Paris: EDK, pp 328-334, 1997.

**Houlihan JM**, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, y Holmes CH. *The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression HLA-E and HLA-G*. J Immunol 154: 5665-5674, 1995.

**Hughes AL**, y Nei M. *Ancient interlocus exon exchange in the history of the HLA-A locus*. Genetics 122: 681-691, 1989.

**Humphreys T**, y Reinherz EL. *Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection*. Immunol Today 15: 316-320, 1994.

## I

**Imanishi T**, Wakisaka A, y Gojobori T. *Genetic relationships among various human populations indicated by MHC polymorphisms*. En: *HLA 1991*. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds). Vol I, Oxford: Oxford University Press, pp 627-632, 1992a.

**Imanishi T**, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, y Gojobori T. *Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups*. En: *HLA 1991*. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds). Vol I, Oxford: Oxford University Press, pp 1065-1220, 1992b.

**Ishitani A**, y Geraghty DE. *Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 3947-3951, 1992.

**Israël A**, Kimura A, Keran M, Yano O, Kanellopoulos J, Le Bail, y Kourilsky P. *A common positive trans-acting factor binds to enhancer sequences in the promoters of mouse H-2 and  $\beta$ 2-microglobulin genes*. Proc Natl Acad Sci USA 84: 2653, 1987.

**Izaabel H**, Garchon HJ, Caillat-Zucman Gaurain G, Akhayat O, Bach JF, y Sánchez-Mazas A. *HLA class II DNA polymorphism in a Moroccan population from the Souss, Agadir area*. Tissue Antigens 51: 106-110, 1998.

## J

**Jabrane-Ferrat N**, Fontes JD, Boss JM, y Peterlin BM. *Complex architecture of major histocompatibility complex class II promoters: reiterated motifs and conserved protein-protein interactions*. Mol Cell Biol 16: 4683-4690, 1996.

**Jackses M**, Lubell D, y Meiklejohn C. *On physical anthropological aspects of the Mesolithic-Neolithic transition in Iberian Peninsula*. Curr Anthropol 38: 839-846, 1997.

**Jordan BR**, Caillol A, Damotte M, Delovitch T, Ferrier P, Kahn-Perles B, Kourilsky F, Layet C, Le Bouteiller P, Lemonnier FA, y col. *HLA class I genes: from structure to expression, serology and function*. Immunol Rev 84: 73-92, 1985.

## K

**Karlsson L**, Surth CD, Sprent J, y Peterson PA. *A novel class II MHC molecule with limited tissue distribution*. Nature 351: 485-488, 1991.

**Kaufman JF**, Anffray C, Korman AJ, Shackelford DA, y Strominger JL. *The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex*. Cell 36: 1-13, 1984.

**Kelly AP**, Monaco JJ, Cho S, y Trowsdale J. *A new human HLA class II-related locus, DM*. Nature 358: 571-576, 1991a.

**Kelly AP**, Powis SH, Glynne R, Radley E, Beck S, y Trowsdale J. *Second proteasome-related gene in the human MHC class II region*. Nature 353: 667-668, 1991b.

**Kinder H**, y Hilgemann W. *Die Urbewohner*. En: *Atlas zur Weltgeschichte*. Munich: Deutscher Taschenbuch Verlag, p 129, 1970.

**Kirszenbaum M**, Moreau P, Gluckman E, Dausset J, y Carosella E. *An alternatively spliced form of HLA-G in human trophoblast and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 4209-4213, 1994.

**Klein J**. *Evolution and function of the major histocompatibility system; facts and speculations. The major histocompatibility system in man and*

- animal. Götze D (ed). New York: Springer-Verlag, pp 339-378, 1977.
- Klein J.** *Natural History of the Major Histocompatibility complex.* New York: Wiley, 1986.
- Klein J.** *The major histocompatibility complex.* Immunology. Klein J (ed). Massachusetts: Blackwell Scientific Publications., pp 161-187, 1990.
- Koller BH,** Geraghty DE, Shimizu Y, De Mars R, y Orr HT. *HLA-E: a novel class I gene expressed in resting T lymphocytes.* J Immunol 141: 897-904, 1988.
- Köning R,** Huang LY, y Germain RN. *MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8.* Nature 356: 796-798, 1992.
- Koopmann JO,** Hämmerling GI, y Momburg F. *Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules.* Curr Opin Immunol 9: 80-88, 1997.
- Kovacsovics-Bankowski M,** y Rock KL. *A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules.* Science 267: 243-246, 1995.
- Kvist S,** Wiman K, Claesson L, Peterson PA, y Dobberstein B. *Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens.* Cell 29: 61-69, 1982.
- ## L
- Lalueza-Fox C.** *Physical anthropological aspects of the Mesolithic-Neolithic transitions in the Iberia Peninsula.* Curr Anthropol 37: 689-695, 1996.
- Lam AM.** *De l'origine égyptienne des peuls.* Paris: Khepera and Presence Africaine, 1996.
- Latron F,** Pazmany L, Morrison J, Moots R, Saper MA, McMichael A, y Strominger JL. *A critical role for conserved residues in the cleft of HLA-A2 in presentation of a nonapeptide to T cells.* Science 257: 964-967, 1992.
- Le Bouteiller P.** *HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions.* Crit Rev Immunol 14: 89-129, 1994.
- Lehner P,** y Cresswell P. *Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules.* Curr Opin Immunol 8: 59-67, 1996.
- Liljedahl M,** Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson MR, Peterson PA, y Karlsson L. *HLA-DQ is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport.* Embo J 15: 4817-4824, 1996.
- Long EO.** *Signal sequences stop killer cells.* Nature 19: 740-741, 1998.
- Louis P,** Eliaou JF, Kerlan-Candon S, Pinet V, Vincet R, y Clot J. *Polymorphism in the regulatory region of the HLA-DRB genes correlating with haplotype evolution.* Immunogenetics 38: 21-26, 1993.
- Loyadu-Platonos S,** y Marinatau N. *Creta.* Uytovias: I Mathioulakis and Co., 1985.
- Lubell D,** Jackes M, Schwaroz H, Knyf M, y Meiklejohn C. *The Mesolithic-Neolithic transition in Portugal: Isotopic and dental evidence of diet.* J Archeol Sci 21:201-216, 1994.
- ## M
- Madden DR,** Gorga JC, Strominger JL, y Wiley DC. *The structure of HLA-B27 reveals nonamers self-peptides bound in an extended conformation.* Nature 353: 321-325, 1991.
- Madden DR,** Gorga JC, Strominger JL, y Wiley DC. *The three dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggest a general mechanism for tight peptide binding to MHC.* Cell 70: 1035-1048, 1992.
- Madden DR.** *The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes.* Annu Rev Immunol. 13: 587-622, 1995.
- Maguire J,** Frels W, Richardson J, Weissman J, y Singer D. *In vivo function of regulatory DNA sequence elements of a MHC class I gene.* Mol Cell Biol 20: 3078-3086, 1992.
- Malaspina P,** Cruciani F, Ciminelli B, Terrenato L, Santolamazza P, Alonso A, Banyko J, Brdicka R, García O, Gaudiano C, Guanti G, Kidd K, Lavinha J, Avila M, Mandich P, Moral P, Qamar R, Mehdi S, Ragusa A, Stefanescu G, Caraghin M, Tyler-Smith C, Scozzari R, y Novelletto A. *Network analyses of Y-chromosomal types in Europe, northern Africa, and western Asia reveal specific patterns of geographic distribution.* Am J Hum Genet 63: 847-860, 1998.
- Malissen M,** Malissen B, y Jordan BR. *Exon-intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene.* Proc Natl Acad Sci USA 79: 893-897, 1982.
- Marchand P.** *Creta.* Paris: Editions Nouveaux-Loisirs, 1994.
- Marks MS,** Germain RN, y Bonifacino JS. *Transient aggregation of major histocompatibility complex*

- class II chains during assembly in normal spleen cells.* J Biol Chem 270: 10475-10481, 1995.
- Martínez-Laso J**, De Juan D, Martínez-Quiles N, Gómez-Casado E, Cuadrado E, y Arnaiz-Villena A. *The contribution of the HLA-A, -B, -C and -DR, -DQ DNA typing to the study of the origins of Spaniards and Basques.* Tissue Antigens 45: 237-245, 1995.
- Martínez-Laso J**, Gazit E, Gómez-Casado E, Morales P, Martínez-Quiles N, Alvarez M, Martín-Villa JM, Fernández V, y Arnaiz-Villena A. *HLA-DR and DQ polymorphism in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews: comparison with other Mediterraneans.* Tissue Antigens 47: 63-71, 1996.
- Mason PM**, y Parham P. *HLA class I region sequences, 1998.* Tissue Antigens 51: 417-466, 1998.
- Matsumura M**, Fremont DH, Peterson PA, y Wilson IA. *Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules.* Science 257: 927-934, 1992.
- Matsushima G**, Itoh-Lindstrom Y, y Ting JPY. *Activation of the HLA-DRA gene in primary human T lymphocytes: novel usage of TATA and the X and Y promoter elements.* Mol Cell Biol 12: 5610-5619, 1992.
- McCauley JF**, Schaber GG, Breed CS, y Grotier MJ. *Subsurface valleys and geoarcheology of eastern Sahara revealed by shuttle radar.* Science 218: 1004-1020, 1982.
- McEvedy C**, y Jones R. *Atlas of World Population History.* London: Harmondsworth Penguin Books, p 99, 1978.
- McKenzie D.** *Creta y el pre-helénico europeo,* Madrid: Studio Editions, ME eds, 1996.
- Mehra NK**, Rajalingam R, Kanga U, McEnemy L, Cullen M, Agarwal S, Middleton D, Pollack MS, Amirzargar A y Singal DP. *Genetic diversity of HLA in the populations of India, Sri Lanka and Iran.* En: *Genetic diversity of HLA Functional and Medical implications.* Charron D (ed). Vol I, Paris: EDK, pp 314-320, 1997.
- Meiklejohn C**, Schentag CT, Venema A, y Key P. *Socioeconomic change and patterns of pathology and variation in the Mesolithic and Neolithic of Western Europe: Some suggestions.* En: *Paleopathology at the Origins of Agriculture.* Cohen MN and Armelagos GJ (eds). Orlando: Academic Press, pp 75-100, 1984.
- Melian A**, Beckman EM, Porcelli SA, y Brenner MB. *Antigen presentations by CD1 and MHC-encoded class I like molecules.* Curr Opin Immunol 8: 82-88, 1996.
- Melnick J**, y Argon Y. *Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors.* Immunol Today 16: 243-250, 1995.
- Mittal KK**, Mickey MR, Singal DP, y Terasaki PI. *Serotyping for homotransplantation XVIII. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test.* Transplantation 6: 913-917, 1968.
- Momburg F**, Roelse J, Hämmerling GJ, y Neefjes JJ. *Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transport.* J Exp Med 179: 1613-1623, 1994.
- Moreno CS**, Emery P, West JE, Durand B, Reith W, Mach B, y Boss JM. *Purified X2BP cooperatively binds the class II MHC X box region in the presence of purified RFX the X box factor deficient in the bare lymphocyte syndrome.* J Immunol 155: 4313-4321, 1995.

## N

**Nei M.** *Genetic distances between populations.* Am Nat 106: 283, 1972.

**Norbury CC**, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, y Watts C. *Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages.* Immunity 3: 783-791, 1995.

**Nossner E**, y Parham P. *Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules.* J Exp Med 181: 327-337, 1995.

## O

**Otta T.** *Dispan: genetic distance and phylogenetic analysis.* Pennsylvania State University, 1993.

**O'Callaghan CA**, Tormo J, Willcox BE, Blundell CD, Jakobsen BK, Stuart DI, McMichael AJ, Bell JI, y Jones EY. *Production, crystallization, and preliminary X-ray of the human MHC class Ib molecule HLA-E.* Protein Sci 7: 1264-1266, 1998.

**Ozato K.** *Control of MHC class I gene expression in modulation of MHC antigen expression and disease.* Cambridge University Press, 1995.

## P

**Parham P**, Lomen CE, y Lawlor DA. *Nature of polymorphism in HLA-A, -B y -C molecules.* Proc Natl Acad Sci USA 85: 4005-4009, 1988.



- Pieters J**, Bakke O, y Dobberstein B. *The MHC class II associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail*. *J Cell Sci* 106: 831-842, 1993.
- Pieters J**. *MHC class II restricted antigen presentation*. *Curr Opin Immunol* 9: 89-96, 1997.
- Pinto F**, González AM, Hernández M, Larruga JM, y Cabrera VM. *Genetic relationship between the Canary Islanders and their African and Spanish ancestors inferred from mitochondrial DNA sequences*. *Ann Hum Genet* 60: 321-330, 1996.
- Ploegh HL**, Orr HT, y Strominger JL. *Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2A) class I molecules*. *Cell* 24: 287-299, 1981.
- Pozzo G**, Ciullo M, Autiero M, y Guardiola J. *Control of nucleo-cytoplasmic HLA-DRA mRNA partitioning by interaction of a retention signal with compartmentalized proteins*. *J Mol Biol* 240: 193-204, 1994.
- 
- ## R
- Rachid Raha A**. *Imazighen del Magreb entre oriente y occidente (Introducción a los bereberes)*. Granada: AR. Raha, 1994.
- Radley E**, Alderton RP, Kelly A, Trowsdale J, y Beck S. *Genomic organization of HLA-DMA and HLA-DMB. Comparison of the gene organization of all six class II families in the human MHC*. *J Biol Chem* 22, 269: 18834-18838, 1994.
- Rammensee HG**, Falk K, y Rötzschke O. *Peptide naturally presented by MHC class I molecule*. *Ann Rev Immunol* 11: 213-244, 1993.
- Rammensee HG**, Friede T, y Stephanovic S. *MHC ligands and peptide motifs: first listing*. *Immunogenetics* 41: 178-228, 1995.
- Ramos-Oliveira J**. *Historia de España: La prehistoria*. Mexico: Oasis, Vol 1, pp 199, 202, 273, 346, 348, y 437, 1971a.
- Ramos-Oliveira J**. *Historia de España: La antigüedad*. Mexico: Oasis, Vol 2, p 278, 1971b.
- Realini C**, Dubiel W, Pratt G, Ferrel K, y Rechsteiner M. *Molecular cloning and expression of  $\alpha$ -interferon-inducible activator of the multicatalytic proteasome*. *J Biol Chem* 269: 20727-20732, 1994.
- Reith W**, Satola S, Herrero-Sanchez C, Amaldi I, Lisowska-Groszpiere B, Griscelli C, Hadam MR, y Mach B. *Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lacks a specific HLA-DR promoter binding protein, RF-X*. *Cell* 53: 897-906, 1988.
- Renfrew C**. *Archeology and Language: The puzzle of Indo-European Origins*. London: Jonathan Cape, 1987.
- Roche PA**, Marks MS, y Cresswell P. *Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain*. *Nature* 354: 392-394, 1991.
- Roitberg-Tambur A**, Wittes CS, Friedmann A, Safirman C, Sherman L, Battat S, Nelken D, y Brautbar C. *Comparative analysis of HLA polymorphism at the serologic and molecular level in Moroccan and Ashkenazi Jews*. *Tissue Antigens* 46: 104-110, 1995.
- Ronchi A**, Bellorini M, Mongelli N, y Mantovani R. *CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CPI) recognizes the minor groove and distorts DNA*. *Nucleic Acids Res* 23: 4565-4572, 1995.
- Rudensky AY**, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, y Janeway CA Jr. *Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules*. *Nature* 353: 622-627, 1991.
- Rudensky AY**, Preston-Hurlburt P, Al-Ramadi BK, Rothbard J, y Janeway CA Jr. *Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs*. *Nature* 359: 429-431, 1992.
- Ruhlen M**. *The Basque language is included in the Dene-Caucasian language family*. En: *Prehistoric Iberia: Genetics, Anthropology and Linguistics*. Arnaiz-Villena A (ed). Kluwer, 2000.
- 
- ## S
- Sadasivan B**, Lehner PJ, Ortman B, Spies T, y Cresswell P. *Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP*. *Immunity* 5: 103-114, 1996.
- Saiki RK**, Scharf S, Falaona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich H, y Arnheim M. *Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science* 230: 1350-1354, 1985.
- Saitou N**, y Nei M. *The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Mol Biol Evol* 4: 406-425, 1987.
- Saji M**, Moriarte J, Ban T, Singer D, y Kohn L. *MHC class gene expression in rat thyroid cells is regulated by hormones, Methimazole and Iodine as well as Interferon*. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 871-878, 1992.

- Salter RD**, Benjamin RJ, Wesley PK, Buxton SE, Garrett TPJ, Clayberger C, Krensky AM, Norment AM, Littman DR, y Parham P. *A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the  $\alpha 3$  domain of HLA-A2*. Nature 345: 41-46, 1990.
- Sambrook J**, Fritsch EF, y Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Sambrook J, Fritsch EJ, Maniatis T (eds). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sanger F**, Nicklen S, y Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA 71: 5463-5467, 1977.
- Santachiara-Benerecetti AS**, y Semino O. *Y chromosome polymorphisms and history of populations*. Cell Pharmacol 3: 199-204, 1996.
- Saper MA**, Bjorkman PJ, y Wiley DC. *Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at a 2.6 Å resolution*. J Mol Biol 219: 277-319, 1991.
- Seiling P**, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzacario RJ, Soriano T, Bloom BR, Brenner MB, Kronenberg M, Brennan PJ, y Modlin R. *CD1 restricted T cell recognition of lipoglycan antigens*. Science 269: 227-230, 1995.
- Sellier J**, y Sellier A. *Atlas des Peuples d'Orient*. Paris: Editions La Decouverte, 1993.
- Shackelford DA**, y Strominger JL. *Analysis of the oligosaccharides on the HLA-DR and DC B cell antigens*. J Immunol 130: 274-282, 1983.
- Shrivastava R**, Duceman BW, Biro PA, Sood AS, y Weissman SM. *Molecular organization of the class I gene of human Major Histocompatibility complex*. Immunol Rev 84: 93-121, 1985.
- Shrivastava R**, Chonery MJ, y Lawrance SK. *Structure, expression, and molecular mapping of a divergent member of the class I HLA gene family*. Proc Natl Acad Sci USA 84: 4224-4228, 1987.
- Singer DS**, y Maguire JE. *Regulation of the expression of class I MHC gene*. Crit Rev Immunol 10: 235-257, 1990.
- Sinha S**, Maity SN, Lu J, y De Crombrughe B. *Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3*. Proc Natl Acad Sci USA 92: 1624-1628, 1995.
- Sloan VS**, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, y Zaller DM. *Mediation by HLA-DM of dissociation of peptide from HLA-DR*. Nature 375: 802-806, 1995.
- Smith KJ**, Reid SW, Stuart DI, McMichael AJ, Jones EY, y Bell JI. *An altered position of the alpha 2 helix of MHC class I is revealed by the crystal structure of HLA-B\*3501*. Immunity 4: 203-213, 1996a.
- Smith KJ**, Reid SW, Harlos K, McMichael AJ, Stuart DI, Bell JI, y Jones EY. *Bound water structure and polymorphic amino acids act together to allow the binding of different peptides to MHC class I HLA-B53*. Immunity 4: 215-228, 1996b.
- Spies T**, Bresnahan M, Bahram S, Arnold D, Blanck G, Mellins E, Pious D, y DeMars R. *A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway*. Nature 348: 744-747, 1990.
- Steimley V**, Siegrist CA, Mottel A, Lisowska-Grospierre B, y Mach B. *Regulation of MHC class II expression by interferon- $\gamma$  mediated by the transactivator gene CIITA*. Science 265: 106-108, 1994.
- Stern LJ**, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, y Wiley DC. *Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide*. Nature 368: 215-221, 1994.
- Story CM**, Mikulska JE, y Simister NE. *A major histocompatibility complex class I like Fc-receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of IgG from mother to fetus*. J Exp Med 180: 2377-2382, 1994.
- Stroynowski I**, y Forman J. *Novel molecules related to MHC antigens*. Curr Opin Immunol 7: 97-102, 1995.
- Summers CW**, Hampson VJ, y Taylor GM. *HLA class I non-coding nucleotide sequences, 1992*. Eur J Immunogenet 20: 201-240, 1993.

## T

- Terasaki PI**, y McClelland JD. *Microdroplet assay of human serum cytotoxins*. Nature 204: 998-100, 1964.
- The MHC sequencing consortium**. *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex*. Nature 401: 921-923, 1999.
- Ting JPY**, Painter A, Zelenik-Le NJ, MacDonald G, Moore TM, Brown A, y Schwartz BD. *YB-1 DNA-binding protein represses interferon- $\gamma$  activation of class II histocompatibility complex genes*. J Exp Med 179: 1605-1611, 1994.
- Tonnelle C**, De Mars R, y Long EO. *DO $\beta$ : a new  $\beta$  chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression*. Embo J 4: 2839-2847, 1985.

**Trowsdale J**, y Kelly A. *The human class II  $\alpha$  chain gene D $\alpha$  is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions.* Embo J 4: 2231-2237, 1985.

**Trowsdale J**, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, y Kelly A. *Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the ABC superfamily of transporters.* Nature 348: 741-744, 1990.

**Tulp A**, Verwoerd D, Dobberstein B, Ploegh HL, y Pieters J. *Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment.* Nature 369: 120-126, 1994.

## U

**Ulbrecht M**, Kellerman J, Johnson JP, y Weiss EH. *Impaired intracellular transport and cell surface expression of no-polymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding.* J Exp Med 176: 1083-1090, 1992.

## V

**Vallejo AN**, y Pease LR. *Structure of the MHC A and B locus promoters in hominoids.* J Immunol 154: 3912-3921, 1995.

**Van Ham SM**, Tjin EPM, Lillemeier BF, Gruneberg U, Van Meigaarden KE, Pastoors L, Verwoerd D, Tulp A, Canas B, Rahman D, Ottenhoff THM, Pappin DJC, Trowsdale J, y Neefjes J. *HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading.* Curr Biol 7: 950-957, 1997.

**Vassilakos A**, Cohen-Doyle MF, Peterson PA, Jackson MR, y Willians DB. *The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules.* Embo J 15: 1495-1506, 1996.

**Vilen BJ**, Penta JF, y Ting JPY. *Structural constraints within a trimeric transcriptional regulatory region. Constitutive and interferon-inducible expression of the HLA-DRA gene.* J Biol Chem 267: 23728-23734, 1992.

**Villar F**. *Los Indoeuropeos y los orígenes de Europa.* Madrid: Gredos, 1996.

## W

**Wei X**, y Orr HT. *Differential expression of HLA-E, HLA-F and HLA-G transcripts in human tissue.* Hum Immunol 29: 131-142, 1990.

**Wright KL**, White LC, Kelly A, Beck S, Trowsdale J, y Ting JPY. *Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter.* J Exp Med 181: 1459-1471, 1995.

## Y

**Yoshida M**, Kimura A, Numano F, y Sasazuki T. *Polymerase-Chain-Reaction-Based Analysis of Polymorphism in the HLA-B Gene.* Hum Immunol 34: 257-266, 1992.

**Young FW**, y Bann CM. *A visual statistics system.* En: *Statistical computing environments for social researches.* Fox RA (ed). New York: Sage publications, pp 207-236, 1996.

## Z

**Zemmour J**, y Parham P. *A ribosomal protein-like sequence in the 3'untranslated region of the HLA-F gene.* Tissue Antigens 40: 250-253, 1992.

**Zhang W**, Young ACM, Imarai M, Mathenson SG, y Sacchettini JC. *Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2Kb molecule containing a single viral peptide: implications for peptide binding and T-cell receptor recognition.* Proc Natl Acad Sci USA 89: 8403-8407, 1992.

# **ANEXO I**

## ABREVIATURAS MÁS COMUNES UTILIZADAS EN EL TEXTO

<b>aas:</b>	Aminoácidos
<b>β2-m:</b>	β 2 microglobulina
<b>cDNA:</b>	DNA complementario
<b>CM:</b>	Centimorgan
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>HLA:</b>	Antígenos Leucocitarios Humanos
<b>Ii:</b>	Cadena invariante
<b>Kb:</b>	kilo-base (1000 pb)
<b>Kd:</b>	Kilodalton
<b>NJ:</b>	Neighbor-joining
<b>MHC:</b>	Sistema Principal de Histocompatibilidad
<b>mtDNA:</b>	DNA mitochondrial
<b>pb:</b>	par de bases de DNA
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SGD:</b>	Distancias genéticas estándar
<b>TAP:</b>	Transportadores asociados con el procesamiento de antígeno
<b>TcR:</b>	Receptor del linfocito T
<b>TNF:</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>UT:</b>	Región no traducida

## **ANEXO II**

---

**ARTÍCULOS ORIGINALES QUE CONTIENEN EN MODO PARCIAL LOS RESULTADOS  
OBTENIDOS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL**

1. Arnaiz-Villena A, Benmamar D, Alvarez M, Díaz-Campos N, Varela P, **Gómez-Casado E**, y Martínez-Laso J. *HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. Relatedness to Spaniards and Basques*. Hum Immunol 43: 259-268, 1995.
2. Martínez-Laso J, De Juan D, Martínez-Quiles N, **Gómez-Casado E**, Cuadrado E, y Arnaiz-Villena A. *The contribution of the HLA-A, -B, -C and -DR, -DQ DNA typing to the study of the origins of Spaniards and Basques*. Tissue Antigens 45: 237-245, 1995.
3. Martínez-Laso J, Gazit E, **Gómez-Casado E**, Morales P, Martínez-Quiles N, Alvarez M, Martín-Villa JM, Fernández V, y Arnaiz-Villena A. *HLA-DR and DQ polymorphism in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews: comparison with other Mediterraneans*. Tissue Antigens 47: 63-71, 1996.
4. Arnaiz-Villena A, Martínez-Laso J, **Gómez-Casado E**, Díaz-Campos N, Santos P, Martinho A, y Breda-Coimbra E. *Relatedness among Basque, Portuguese, Spaniards and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes*. Immunogenetics 47: 37-43, 1997.
5. **Gómez-Casado E**, Del Moral P, Martínez-Laso J, García-Gómez A, Allende L, Silvera-Redondo C, Longas J, González-Hevilla M, y Arnaiz-Villena A. *HLA genes in Arab-speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians*. Tissue Antigens 55: 239-249, 2000.

