



*FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE HLA-B Y HLA-B*27 EN UN GRUPO DE
INDIVIDUOS SANOS EN COLOMBIA*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C., JUNIO DE 2019



*FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE HLA-B Y B*27 EN UN GRUPO DE
INDIVIDUOS SANOS EN COLOMBIA*

ESTUDIANTE

NATALIA ANDREA HERNÁNDEZ BOCANEGRA

ASESOR EXTERNO

MARÍA CONSUELO ROMERO SÁNCHEZ, MSc, PhD.

LEIDY LORENA CHILA MORENO, Bcl, MSc.

ASESOR INTERNO

ALEJANDRA DEL PILAR INFANTE CRUZ, MSc.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C., JUNIO DE 2019

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres y hermanos su compañía y apoyo incondicional me ha impulsado para llegar hasta aquí...

AGRADECIMIENTOS

A quienes me permitieron trabajar en el desarrollo del presente proyecto y me acompañaron en este proceso destinando parte de su valioso tiempo para asesorarme:

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Alma máter

Alejandra Del Pilar Infante

Asesora Interna

Dra. María Consuelo Romero Sánchez.

Directora del proyecto. Servicio de Reumatología e Inmunología Hospital Militar Central – Instituto UIBO-Unidad de Investigación Básica Oral. Universidad El Bosque.

Leydi Lorena Chila Moreno

Asesora. Instituto UIBO-Unidad de Investigación Básica Oral. Universidad El Bosque.

Servicio de Reumatología e Inmunología.

Hospital Militar Central.

Instituto UIBO-Unidad de Investigación Básica Oral.

Universidad El Bosque.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2. ANTECEDENTES	4
3. MARCO TEORICO	11
3.1. COMPLEJO MA YOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	11
3.2. ANTIGENO LEUCOCITARIO HUMANO HLA	12
3.3. MOLECULAS HLA	14
3.4. PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS	16
3.4.1. Procesamiento péptidos clase I.....	16
3.4.2. Procesamiento de péptidos por HLA-II	21
3.5. HLA-B*27 Y ASOCIACIÓN CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE	24
4. DISEÑO METODOLÓGICO	26
4.1. UNIVERSO, POBLACIÓN, MUESTRA	26
4.1.1. Tipo de investigación	26
4.1.2. Población	26
4.1.3. Muestra	26
4.1.4. Selección de la muestra	26
4.1.5. Criterios de inclusión.....	27
4.1.6. Criterios de Exclusión.....	27
4.1.7. Análisis de tipificación de antígeno HLA-B	27
4.1.8. Análisis estadístico	28
4.2. HIPÓTESIS	28
4.3. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	28
4.3.1. Extracción de DNA.....	28
4.3.2. Cuantificación.....	30
4.3.3. Amplificación por PCR.....	31
4.3.4. Hibridación.....	32
4.3.5. Tipificación HLA-B27 por técnica de Luminex IS 100/200	33
4.3.6. Secuenciación HLA de alta resolución	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1. Descripción de la muestra:	34
5.2. Frecuencia Genotípica del HLA -B.....	36
5.3. Frecuencia alélica del HLA-B	38
5.4. Frecuencia Haplotípica.....	41

5.5. Frecuencia HLA-B*27	42
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS	52
9. ANEXOS	63
9.1 Resultados secuenciación de alta resolución	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Espondiloartritis asociadas a HLA-B*27. Tomado de	25
Tabla 2. Análisis Demográfico	34
Tabla 3. Frecuencias Genotípicas HLA-B	36
Tabla 4. Frecuencias alélicas HLA-B	38
Tabla 5. Frecuencias Haplotípicas ABDR	41
Tabla 6. Distribución por edad y género en individuos HLA-B*27 positivos	43
Tabla 7. Haplotipos ABDR para HLA-B*27 positivos	43

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Herencia mendeliana de haplotipos HL	13
Fig 2. Modelos moleculares de moléculas HLA de clase I (A – C) y clase II (D – F).....	13
Fig 3. Vía de presentación del antígeno MHC clase I	20
Fig 4. Vías de presentación del antígeno HLA clase I y clase II.....	¡Error! Marcador no definido.
Fig 5. Distribución de genotipos HLA-B	37
Fig 6. Distribución de alelos HLA-B.....	40
Fig 7. Distribución de genotipos y alelos por departamento	41

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

IPD-IMGT: Base de datos de inmuno polimorfismo- sistema internacional de información inmunogenética.

OMS: Organización Mundial de la Salud

MCTX: Microlinfocitotoxicidad

CMFd: Citometria de flujo digital

CMFa: Citometria de flujo análoga

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-SSP: Reacción en cadena de la polimerasa con primers de secuencia específica

PCR-SSO: Reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos específicas

SNC: Sistema nervioso central

HV: Hipervariables

ER: Retículo endoplasmico

TAP: Transportador asociado con el procesamiento de péptidos

CTR: Calreticulina

CNX: Calnexina

PDI: Proteína disulfuro Isomerasa

PLC: Complejo de carga de péptidos

DRIPs: Productos ribosómicos defectuosos

ERAP: Aminopeptidasa 1 asociada a ER

ERAAP: Aminopeptidasa ER asociada con el procesamiento de antígenos

TECS: Células epiteliales del timo

CTL: Linfocitos T citotóxicos

ROS: Especies reactivas de oxígeno

APC: Células presentadoras de antígenos

CLIP: Péptido de cadena invariante asociado a la clase II

DC: Célula dendrítica

CODHES: consultoría para los derechos humanos y el desplazamiento



*FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DE HLA-B Y B*27 EN UN GRUPO DE
INDIVIDUOS SANOS COLOMBIANOS*

RESUMEN

Varios de los genes de la respuesta inmune se encuentran en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El sistema de antígenos de leucocitos humanos (HLA) es un conjunto de moléculas de superficie de células altamente polimórficas que se unen a péptidos derivados del procesamiento antigénico con la finalidad de presentárselos a los linfocitos T, para inducir su activación y función efectora. Dentro de los alelos de clase I se encuentran el HLA-B y su subtipo HLA-B*27 que está altamente asociado con la presencia de enfermedades musculo esqueléticas.

El objetivo de este proyecto de investigación es la caracterización de los genotipos y alelos HLA-B y su subtipo B*27 específicamente en una población de individuos sanos colombianos y así evidenciar la variabilidad genética producto del mestizaje.

La muestra comprendió 255 individuos sanos, sin clínica sugestiva de enfermedades reumáticas, remitidos al laboratorio de Inmunología del Hospital Militar Central desde el año 2015 al 2018 con solicitud de tipificación HLA- A, B, DR por sistema molecular SSO-LUMINEX IS 100/200. Los resultados mostraron 27 genotipos y 89 alelos HLA-B, así mismo, trece sujetos fueron positivos para el antígeno B*27 correspondientes a los alelos más frecuentemente reportados en población colombiana y latinoamericana.

PALABRAS CLAVE: HLA-B, HLA-B*27, frecuencia alélica, frecuencia genotípica, sistema LUMINEX IS 100/200.

INTRODUCCIÓN

Los genes que codifican para el sistema de antígenos de leucocitos humanos (HLA), son muy polimórficos, además, están ligados y forman parte del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), ocupan un gran segmento de ADN aproximadamente 3500 kb y se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.1 - 6p21.3). Existen tres genes de la clase I del MHC llamados HLA-A, HLA-B, HLA-C, que están encargados de dirigir funciones muy importantes dentro de la homeostasis del organismo, que van desde la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, pasando por la presentación de péptidos propios, hasta la presentación antígenos a linfocitos T CD4 (ayudadores) y CD8 (citotóxicos) responsables de la respuesta inmune efectora (1).

El sistema HLA se encuentra en equilibrio genético siguiendo la ley de Hardy Weinberg; las frecuencias genotípicas están determinadas por las frecuencias alélicas de la población y permanecen estables de generación en generación, siempre que la población sea grande y que los emparejamientos entre individuos se produzcan al azar (2), es así, como la combinación de genes transmitidos en un solo cromosoma proveniente de cada uno de los padres, se heredan completos de forma mendeliana y se expresan de forma codominante, con frecuencias de recombinación de alrededor del 1% y con distribuciones que varían significativamente en los diferentes grupos étnicos (3).

A finales del siglo XV, la población colombiana sufrió un proceso de mezcla con la llegada de los europeos y varios años más tarde de poblaciones africanas, lo que implicó diferencias significativas en poblaciones nativas. La literatura describe a la región del Pacífico con mayor ascendencia africana y la región Andina y Orinoquía con mayor proporción de ancestros europeos (4).

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, dentro de la familia HLA clase I, existen varios alelos como A, B, C, E, F y G entre otros, específicamente en el alelo B se encuentran algunos genotipos como el HLA-B*27, el cual está altamente asociado con la presencia de enfermedades reumáticas como la Espondiloartritis. Por tanto, el papel

patogénico de B27 estaría relacionado con sus características presentadoras de antígeno y con el reconocimiento por células T (5).

El sistema HLA-B27 tiene un alto grado de polimorfismo genético, con aproximadamente 269 subtipos conocidos, según la base de datos IPD-IMGT / HLA versión 3.36.0 del 17 de Abril de 2019, especializada en secuencias del MHC que incluye las secuencias oficiales nombradas por el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el sistema HLA (6). En la literatura se reporta gran cantidad de estudios asociados con enfermedades y la positividad del HLA-B27, pero son pocos los reportes del alelo en población sana y no hay datos de prevalencias exactas que permitan establecer la diferencia en la interpretación de resultados positivos en individuos sanos y pacientes con patologías reumáticas.

Los subtipos de B27 difieren en la distribución étnica, lo que indica distribución de factores genéticos en las diferentes regiones geográficas y de su posible asociación con espondiloartropatías (7). En caucásicos el subtipo prevalente es el B*2705 con una frecuencia del 90% (7). En Europa, la Federación Europea de Inmunogenética determinó el subtipo B*2702 como el más frecuente en cinco regiones de este continente (8). Se considera que del 1 al 2% de la población general es HLA-B*27 positiva, siendo menos frecuente en las población negra y japonesa (< 1%), mientras que en canadienses y noruegos se presenta entre el 4 al 7%, en México se estima que en la población general el 4% es HLA*B27 positivo (9).

Los métodos más utilizados en los laboratorios para la determinación del antígeno HLA-B*27 han sido la microlinfocitotoxicidad (MCTX), posteriormente la citometría de flujo digital (CMFd), la citometría de flujo análoga (CMFa) y últimamente, la reacción en cadena de la polimerasa con primers de secuencia específicos (PCR-SSP) (10). Las técnicas serológicas pueden dar resultados falsos positivos ya que se basan en la detección de antígenos de superficie celular por anticuerpo. Si el antígeno HLA-B*27 está regulado negativamente o conformacionalmente cambiado, la sensibilidad y especificidad de estos métodos pueden disminuir. Además, una gran desventaja de la identificación serológica es

la reactividad cruzada con diferentes antígenos HLA, como el B7 porque se han hecho reportes de su asociación con enfermedades inflamatorias (11).

A su vez, la diferenciación de interpoblaciones e intrapoblaciones se da gracias a algunas combinaciones de genes, lo que se conoce como desequilibrio de ligamento y tiene implicaciones biológicas, además, hay algunos haplotipos en desequilibrio y muchos de ellos son particulares de cada grupo étnico, permitiendo definir grupos específicos, mezclas raciales, distancias genéticas y patrones de migración (12).

Teniendo en cuenta lo anterior, para la tipificación de alelos HLA clase I y II el uso de los métodos moleculares juegan un papel importante en un laboratorio de histocompatibilidad, debido a que el alto grado de polimorfismo del HLA no puede ser analizado por una técnica serológica, es por eso que el desarrollo de técnicas moleculares puede resolver diferencias alélicas y ser compatible con el uso rutinario en laboratorios que realizan determinaciones de HLA ofreciendo ventajas como son la flexibilidad en la resolución, reproducibilidad y mayor precisión, sin embargo, aun así el SSO tiene sus limitaciones (13).

El presente estudio tiene como objetivo describir las frecuencias alélicas y genotípicas del HLA-B y subtipos de HLA-B 27 en individuos colombianos sin clínica sugestiva de enfermedad reumatológica con el fin de generar un perfil genético para determinar posibles asociaciones de genes protectores o susceptibles con enfermedades reumáticas.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer la frecuencia del alelo HLA-B en un grupo de individuos sanos en colombiana.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia genotípica, alélica y haplotípica del HLA-B en población sana colombiana.
- Describir la asociación de las frecuencias genotípicas y alélicas con género y distribución geográfica del HLA B.
- Definir la frecuencia alélica y genotípica del HLA-B*27 en población sana colombiana.
- Identificar la asociación de las frecuencias genotípicas y alélicas con género y distribución geográfica del HLA –B*27.

2. ANTECEDENTES

En diferentes poblaciones del mundo se han descrito informes de frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA- A,-B,-DRB ya que tiene gran importancia

para el estudio donante/receptor, en la constitución de marcadores genéticos para análisis antropológicos y están asociados con diversas enfermedades en cuya etiopatogenia pueden estar involucrados mecanismos inmunológicos, además, de la asociación con genes de protección para ciertas enfermedades en determinadas poblaciones (14).

Los primeros estudios de frecuencias HLA que se desarrollaron en América fueron de los años noventa, en 1992 Caraballo y sus colaboradores determinaron la distribución de antígenos HLA en la población de Cartagena Colombia. Una muestra de 370 individuos sanos no relacionados fue tipificada serológicamente, en 91 de ellos se analizó los alelos del complemento y 47 se tipificaron con ADN mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sondas de oligonucleótidos para el sistema HLA. En este estudio se observó que los alelos más frecuentes fueron el HLA-B*7 (19.1%), B*35 (19.1%) y B*51 (16.3%), el alelo B*27 obtuvo una frecuencia de (1.4%), además, se determinó que la mayoría de los genes HLA de los mulatos son negroides y caucasoides y que la contribución de los asiáticos y amerindios es pequeña, consistente con la historia (15).

En el año 1993 Álvarez y colaboradores estudiaron los alelos HLA clase I en 604 individuos de la ciudad de Montevideo y de otros lugares de Uruguay, utilizando un procedimiento de microinflamatoxicidad para la determinación de los antígenos. Los alelos más frecuentes fueron B*12 y B*35, cuya frecuencia fue de 12% para ambos alelos, estos hallazgos no contradicen la hipótesis que sugiere que la mayoría de población uruguaya es de origen caucásico, con importantes genes africanos y amerindios, de igual manera la frecuencia que obtuvo el alelo B*27 fue de 3.80% (16).

Para 1999, Infante y colaboradores realizaron análisis moleculares de HLA clase I en 100 sujetos pertenecientes a una tribu indígena mexicana, Seri. La tipificación se realizó por reacción en cadena de la polimerasa utilizando sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia (PCR-SSOP) en un nivel de resolución intermedio-bajo. Se encontraron alelos B*35:01, B*35:12 y los genotipos B*40, B*51 y B*15 los cuales

estuvieron presentes en más de 5% de los individuos. Por otra parte, se detectó el alelo B*27:05 en un 2%, lo que permitió discutir que la presencia de B*27 puede ser el resultado de diferentes oleadas de migraciones hacia el sur del país (17).

A comienzos del siglo XXI, en el año 2000 Paradoa y colaboradores determinaron la distribución de los alelos HLA en la población cubana de la Ciudad de la Habana (14). Fueron tipificados 129 donantes de sangre sanos (70 blancos, 42 mestizos y 17 negros) mediante PCR y tipaje de oligonucleótidos y se observó que el alelo HLA-B*35 está presente en un 9,7%, el B*44 en un 9,33%, el B*07 en un 8,89% y el B*53 en un 7,6% como los más comunes, además, encontraron frecuencias elevadas en la distribución de un grupo de alelos, lo que podría estar en relación con ciertas combinaciones que confieran ventajas evolutivas contra patógenos (14).

En el año 2001 Williams y colaboradores realizaron la tipificación empleando PCR-SSOP de alelos HLA-B en muestras de ADN obtenidas de seis poblaciones diversas: 95 individuos Brasileños no relacionados; 50 indígenas de la tribu Kogui de Colombia; 112 donantes de sangre de la Habana entre caucásicos y mulatos; 29 mexicanos pertenecientes a la tribu indígena Seris y 41 individuos de origen mestizo mexicano; 118 donantes de la población Oman situada en la costa sureste de la Península árabe; 149 donantes de Singapur; 100 individuos sanos del Zulú Sudáfrica. Los genotipos más encontrados en los siete grupos fueron HLA-B*15, B*27, B*35, B*39, B*40, B*44 y B*51 y los alelos HLA-B*35:01 y B*44:03 fueron detectados en las siete familias, igualmente, el alelo B*2705 se reportó en cinco de los grupos de estudio, representando posiblemente un alelo ancestral (18,19).

En el año 2004 Alfaro y colaboradores determinaron frecuencias génicas y haplotípicas del sistema HLA en 1330 sujetos pertenecientes a seis provincias del norte de Argentina mediante la tipificación serológica de antígenos HLA de clase I, estableciendo la presencia de B*35 en todas las provincias con una frecuencia aproximada del 15%, así mismo los genotipos B*62, B*60, B*51, B*39, B*44, B*7 y B*8 mostraron frecuencias entre el 4 y el 8% (20).

En otras poblaciones del mundo se han realizado estudios de frecuencias de alelos HLA como el realizado por Pedrón en el 2006, quienes investigaron la distribución de alelos y haplotipos del HLA en 187 individuos migrantes del norte de África residentes en París, esta distribución se comparó con un grupo control de 248 franceses nativos que residían en la misma área, mediante la técnica de PCR-SSO. Se observó que en los migrantes africanos se reveló una mayor diversidad en la distribución de HLA-A y Alelos DRB1, frecuencias más bajas de alelos comunes en la región, como A*0201, B*1501, B*4001, y DRB1*0401 y mayores frecuencias de subtipos menores, tales como A*3002 y DRB1*0402 (21).

En el año 2010 Zhang y colaboradores establecieron la distribución de alelos y haplotipos en la Región Autónoma de Mongolia (Interior de China) en dos etnias, 108 Oroqen y 104 Ewenki, individuos sanos y no relacionadas, los resultados mostraron un total de 21 alelos diferentes de HLA-B en el grupo étnico Oroqen, el genotipo B*15 fue el más prevalente con una frecuencia del 17.92% mientras que para el grupo de origen Ewenki se encontraron 27 alelos HLA-B, el genotipo B*40 fue el más común con una frecuencia del 17.35%. Por otro lado, el B*27 obtuvo una frecuencia de 4.72 en los Oroqen y una frecuencia del 1.02 en los Ewenki, con estos datos se determinó la distribución alélica de los haplotipos HLA A, -B, DRB1 y el árbol filogenético indicó que los grupos de población Oroqen y Ewenki pertenecen al grupo del norte de China (22).

Para este mismo año en Colombia Sandra Bermeo y colaboradores establecieron las frecuencias genotípicas y haplotípicas de HLA-A, B y DRB1 en una población del Huila en Colombia por medio de una caracterización genómica que se realiza mediante PCR-SSP, así mismo, se reportaron los alelos HLA-A, B y DRB1 que obtuvieron frecuencias mayores al 10% los cuales fueron: A*24 (22%), A*02 (17%), B*35 (15%), B*44 (10%), DRB1*04 (18%) y DRB1*13 (11%) (2).

Pocos son los estudios de tipificación de HLA-B*27 en población sana, sin embargo, en el 2012 Muradiye Acar y colaboradores, determinaron la frecuencia de subtipos de HLA-B*27 en 67 pacientes con espondilitis anquilosante y 35 individuos sanos como control en Turquía. La tipificación de HLA-B27 se realizó por PCR-SSP permitiendo la Identificación de cinco alelos los cuales fueron B*27:05 (54.3%), B*27:02 (31.4%), B*27:03 (2.9%), B*27:04 (2.9%) y B*202 / B*27:05 (8.5%), concluyendo que tanto en el grupo de pacientes como en el grupo de control, se observó B*2705 como el alelo más frecuente seguido por B*27:02, los resultados mostraron que la frecuencia de los subtipos HLA-B*27 no es significativamente diferente entre los pacientes y los controles con un valor $P > 0,10$ (23).

Investigaciones demuestran que el alelo HLA-B es el más polimórfico del sistema HLA y es en el cual se ha detectado mayor variabilidad genética. En el 2013 Ana María Arrunátegui y colaboradores establecieron frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II mediante tipificación PCR-SSP en 1230 donantes de una población del suroccidente colombiano. Los genotipos más frecuentes fueron B*35 con frecuencia del 17.7% que coincide con lo reportado en otras poblaciones colombianas como en Bogotá, Medellín y el Huila (7,2), seguido por el B*40 (10.5%) y B*44 (9.5%) esto representa el 37.7% del polimorfismo para este locus. Los alelos HLA-B*07, B*15, B*18, B*39 y B*51 representan el 29.3 % de la variación y junto con los antes mencionados B*35, B*40 y B*44 dan un 67% de variación total para este locus en la población estudiada, por otro lado el B*27 obtuvo una frecuencia del 1.5% (3).

En este mismo año Hajeer y colaboradores evaluaron las frecuencias alélicas y haplotípicas del HLA-A, B, C, DRB1 y DQB1 en Sauditas mediante la secuenciación de próxima generación (NGS) en 158 adultos sanos. El alelo HLA-B más observado fue HLA-B*50:01 con una frecuencia del 15.8% mientras que los alelos B*27:02 y B*27:07 obtuvieron una frecuencia del 0.3%, los resultados de esta investigación son útiles para estudios poblacionales, asociaciones con enfermedades y planificación futura del registro de donantes de médula ósea no relacionados en Arabia (24).

Para el año 2014 Andric y colaboradores establecieron frecuencias alélicas HLA-A, B, C, DRB1 y DQB1 en población Serbia de diferentes partes del país en una muestra de donantes de médula ósea mediante PCR-SSO; permitiendo la identificación de 28 alelos HLA-B, los genotipos más frecuentes fueron HLA-B*35 y HLA-B*51 con frecuencias del 13.1% y 12.8% respectivamente. Los resultados mostraron que la población serbia está estrechamente relacionada con las poblaciones que viven en los Balcanes centrales y las regiones europeas vecinas. El nivel de diversidad alélica encontrado en este estudio es relevante para facilitar la búsqueda de donante compatible no relacionado y proporcionar una población de control saludable de la región (25).

En el 2015 Kongmaroeng y colaboradores, realizaron un informe de frecuencia alélica y haplotípica para tres loci de HLA clase I en dos etnias residentes en Tailandia (170 birmanos y 200 Karen), sin clínica sugestiva y no relacionados. Las frecuencias halladas mediante PCR-SSP mostraron diferencias claras entre las dos poblaciones. En la población Birmana los alelos B*15:02, B*15:32 y B*15:25 fueron los más frecuentes y en Karen los alelos B*15:02 y B*15:20 (26).

Para el año 2016 Genc Sulcebe y Erkena Shyti informaron frecuencias haplotípicas HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1 en una población de 432 individuos sanos, no relacionados de Albania. La tipificación fue realizada por el método PCR-SSO y usando un inmunoensayo de fase sólida basado en perlas Luminex obteniendo así datos de frecuencias genotípicas para HLA-B de la siguiente manera HLA-B*51, B*18, B*35, B*44 y B*07 con una frecuencia acumulada de 57.75% (27).

En la ciudad de Mashhad, noreste de Irán Alireza Esmaeiliy y colaboradores establecieron frecuencias de los alelos HLA-A, B y DRB1 en 500 individuos adultos sanos no relacionados en el año 2017, estos sujetos fueron genotipificados utilizando PCR con iniciadores específicos de baja resolución de secuencia (SSP-PCR), el HLA-B*35 resultó ser el alelo más frecuente, con una frecuencia del 16,4% mientras que el B*27 obtuvo una frecuencia del 1.8% (28).

En este mismo año Loubser y colaboradores estudiaron alelos HLA-A,- B y C en 50 individuos sanos, no relacionados reclutados de la población Sudafricana. La tipificación se realizó por la técnica PCR-SSO, identificando 43 alelos HLA-B siendo el alelo B*070201 el más frecuente (29).

Dentro de los estudios más frecuentes se encuentra el desarrollado por Weiskopf y colaboradores en el 2018, su objetivo era caracterizar las frecuencias de alelos HLA-A, B, C, DP, DQ y DR en una muestra de 339 adultos sanos, donantes de sangre de Managua Nicaragua. La tipificación se realizó usando PCR-SSO, encontrando el alelo B* 4002 más comúnmente con una frecuencia de 0.01732%. Este proyecto respalda investigaciones de la inmunidad de células T con patógenos en la población local (30).

En este mismo año Antonio Arnaiz Villena y colaboradores buscaron genes amerindios crípticos del HLA en población de barranquilla Colombia, la tipificación de ADN se realizó en 188 individuos no relacionados. Se encontraron características HLA genéticas europeas-africanas y solo 1,85% amerindia. Esto contrasta con la población cubana donde el 10% de la población son amerindios según el HLA, además, los alelos HLA-B más frecuentes fueron B*07, B*14, B*15, B*35, B*39, B*44 y B*51 con frecuencias superiores al 4% (31).

Recientemente se publicó un estudio de alelos y haplotipos HLA clase I y II en 1463 unidades de sangre de cordón umbilical en Bogotá, estableciendo 30 alelos HLA-B de los cuales el B*35 (23.02%), B*40 (10.35%), B*44 (9.74%) fueron los más frecuentes, seguidos por B*51, B*7, B*39 con frecuencias mayores o iguales al 5% mientras que el B*27 obtuvo una frecuencia del 1.36% (32).

Basados en estos antecedentes, se desarrolla este estudio con el fin de conocer frecuencias génicas y alélicas en individuos sanos Colombianos que sean útiles para establecer susceptibilidad con enfermedades asociadas genéticamente al HLA y para programas de trasplante de órganos.

3. MARCO TEORICO

3.1. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

En la respuesta inmune se reconocen antígenos que se presentan sobre las superficies celulares derivados de agentes patógenos. Estos péptidos son llevados a la superficie celular por glucoproteínas especializadas de las células hospedadoras, dichas moléculas son codificadas en una agrupación grande de genes que se identificaron por primera vez por sus potentes efectos sobre la respuesta inmunitaria contra tejidos trasplantados, este complejo de genes se denomina complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MHC es poligénico contiene diferente genes, clase I y II, de modo que cada individuo posee un grupo de moléculas con diferentes rangos de especificidades de unión a péptidos. Asimismo, el MHC es muy polimórfico; es decir, hay múltiples variantes de cada gen en la población en conjunto (33).

El origen del MHC fue probablemente un "proto-MHC", un MHC ancestral que apareció antes del sistema inmunitario adaptativo en los vertebrados mandibulares, ya que todos los vertebrados con mandíbula poseen una región MHC completa (34). Aunque este sistema fue originalmente estudiado por su capacidad de conferir tolerancia a injertos de tejido o de trasplantes de órganos, su función principal es proporcionar protección contra patógenos. Esto se logra a través de vías sofisticadas en las que las moléculas MHC de clase I logran presentar antígenos endógenos a las células T CD8+ y las moléculas de clase II presentan antígenos exógenos a CD4+ (35). Dados sus papeles importantes en la enfermedad y el trasplante, los genes HLA (HLA-A, -B, -C, -DRA, -DRB1, -DRB3, -DRB4, DRB5, -DQA1, -DQB1, y -DPB1) han sido el foco de numerosos estudios clínicos y diagnósticos (36).

3.2. ANTIGENO LEUCOCITARIO HUMANO HLA

El MCH humano es conocido como sistema de antígeno leucocitario humano, es una región de 4 megabases (Mb) ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 con la región de clase I en el extremo telomérico y la región de clase II en el extremo centromérico. Contiene más de 200 genes que se expresan de forma codominante en cada individuo siendo la región con mayor densidad y polimorfismo de genes del genoma humano, que se ha descrito hasta ahora (34). El interés continuo en la secuenciación genómica del HLA se deriva por su papel en la regulación de la inflamación, la cascada del complemento y las respuestas inmunes que utilizan las células T. El HLA contribuye en el trasplante clínico y la terapia transfusional, por ejemplo, los trasplantes de riñón que son totalmente compatibles con HLA tienen una significativa supervivencia del injerto en comparación con los injertos de donantes no coincidentes con HLA (37).

Este sistema se asoció por primera vez con enfermedad en 1967, cuando se encontraron antígenos HLA-B con mayor frecuencia en pacientes con linfoma de Hodgkin. Desde entonces, se ha encontrado que la variación dentro del HLA está asociada con casi todas las enfermedades autoinmunes, así como con varias enfermedades infecciosas e inflamatorias y que su estudio es fundamental para estudiar la respuesta del huésped a los agentes patógenos (38). Asimismo, una región genómica del MHC parece estar involucrada en el desarrollo y la plasticidad del sistema nervioso central (SNC), interacciones neurológicas, comportamiento sinápticos y trastornos neurológicos y psiquiátricos (39,40).

Los loci del HLA contienen dos tipos de genes polimórficos, de clase I y clase II, que codifican dos grupos de proteínas homologas, pero con estructuras distintas, y otros genes no polimórficos cuyos productos participan en la presentación del antígeno. Hay tres genes de la clase I del HLA llamados HLA-A, HLA-B y HLA-C y tres de la clase II HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Las moléculas de la clase I se expresan en casi todas las células nucleadas, mientras que las moléculas de la clase II se expresan solo en las células dendríticas, los linfocitos B, los macrófagos y algunos otros tipos celulares (1).

El patrón de variación alélica en las moléculas del HLA es diferente con respecto a la mayoría de los genes codificadores de proteínas, ya que tiende a ocurrir más en intrones que en exones. En los genes de clase I de HLA clásicos, existe una variación relativamente mayor en los exones que en los intrones adyacentes. Además la variación en exones específicos que codifican el dominio de unión a péptidos, los genes DRB son variables en número y posición en diferentes haplotipos (41).

Haplotipos HLA

Los genes de las clases I y II del MHC son los genes más polimórficos presentes en el genoma de cualquier mamífero. La herencia HLA normal de cada individuo se produce por el aporte de un grupo de genes de cada uno de los padres. Estos genes tienen como característica que se heredan en bloque, aunque la recombinación puede ocurrir.

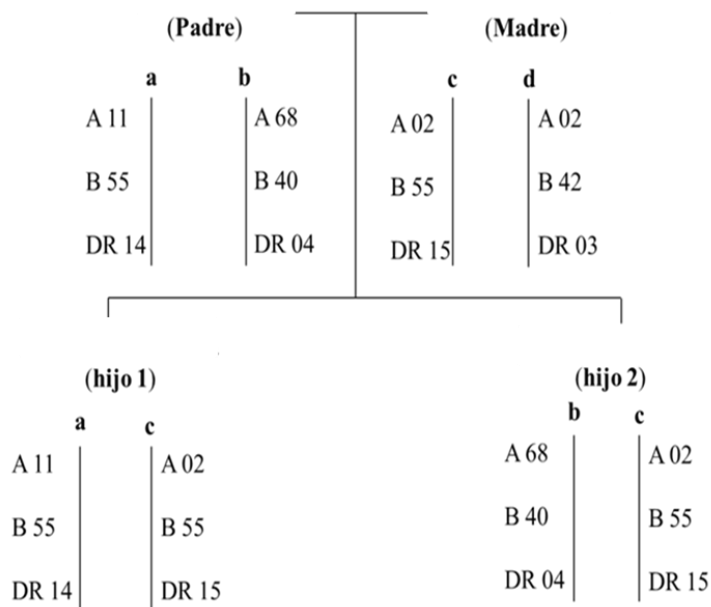


Fig 1. Herencia mendeliana de haplotipos HLA. Ejemplo de un estudio familiar de histocompatibilidad de la presente investigación.

El término haplotipo se refiere a la combinación de genes HLA unidos transmitidos en un cromosoma de un solo padre, cada padre aporta solo uno, es decir que dos hermanos tienen un 25% de probabilidad de ser genóticamente HLA idénticos, un 50% de ser

HLA haploidéntico y un 25% de probabilidad de que no compartan haplotipos HLA. Cuando se obtiene el genotipo HLA en familias con estudio de histocompatibilidad, aproximadamente el 2 % de los hijos pueden mostrar un genotipo HLA recombinante (42). Las posibles combinaciones aleatorias de antígenos de diferentes loci HLA en un haplotipo son enormes, pero ciertos haplotipos HLA se encuentran con más frecuencia en algunas poblaciones de lo que se esperaría por azar. Este fenómeno se denomina desequilibrio de ligamiento, es decir, a una frecuencia mayor que la predicha por las frecuencias individuales (43) .

3.3. MOLECULAS HLA

Los genes MHC-I y MHC-II exhiben un enorme polimorfismo alélico, y la variación de la secuencia de aminoácidos está concentrada en la región de cada estructura que interactúa con los péptidos, permitiendo que diferentes alelos se unan a un rango diferente de péptidos. Las moléculas MHC de clase I son glicoproteínas de la superficie celular expresadas en casi todos los tipos de células de mamíferos nucleados, está completamente ensamblada, compuesta por una cadena pesada polimórfica de 44–49 kDa asociada no covalentemente a una cadena ligera soluble de 12 kDa (microglobulina β_2) (44).

La cadena pesada de HLA clase I tiene tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3), una región transmembrana y un dominio intracitoplasmático en donde los dominios α_1 y α_2 contienen secuencias de aminoácidos variables, y estos determinan las especificidades antigénicas de las moléculas de HLA clase I (45). El dominio α_3 y el β_2m juntos forman inmunoglobulinas constantes mientras que los dominios de cadena pesada α_1 y α_2 forman una estructura única que consiste en una plataforma de ocho cadenas β antiparalelas y dos hélices α antiparalelas en la parte superior de la plataforma. Un surco está formado por las dos hélices α y el piso β , este es el sitio de unión para el antígeno peptídico procesado. El surco de unión al péptido de clase I aloja un péptido procesado de 8 a 10 residuos de aminoácidos (45,46) .

Las moléculas MHC clase II están codificadas por tres genes polimórficos HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP que se unen a diferentes péptidos, al igual que las moléculas HLA de Clase I, las moléculas HLA de Clase II son una familia polimórfica de glicoproteínas transmembrana y se clasifican además como DR, DQ o DP. Los productos de los genes de clase II son heterodímeros de dos cadenas polipeptídicas glicosiladas no covalentemente; son cadenas transmembrana y tienen las mismas estructuras generales con una porción extracelular compuesta de dos dominios ($\alpha 1$ y $\alpha 2$, o $\beta 1$ y $\beta 2$) que está anclada en la membrana por una región transmembrana corta y un dominio citoplasmático (47).

En las moléculas de Clase II, los residuos de aminoácidos que muestran el mayor polimorfismo se encuentran en tres grupos en la cadena β de las moléculas HLA-DR y residen principalmente en el dominio N-terminal. Estos grupos se han etiquetado como regiones "hipervariables" (Hv). En general, los residuos polimórficos en las regiones Hv alinean la parte inferior y los lados de la ranura de unión peptídica (48).

La estructura de unión al péptido consiste en un surco distal de la membrana formada por dos hélices α antiparalelas que cubren una lámina β de ocho cadenas mientras que en el caso de HLA-I, el surco corresponde a una secuencia de aminoácidos contigua formada por la región N-terminal de la única subunidad codificada por la cadena pesada, mientras que para HLA-II se forma por la yuxtaposición de la N-terminal (41). Para ambas moléculas, la región proximal de la membrana consiste en dos dominios conservados. Cada una de las moléculas HLA-I y -II tienen una plataforma estructuralmente homóloga capaz de unirse a péptidos con una afinidad muy alta que puede empalmar al receptor de células T. Una diferencia significativa es que, para el HLA-I, el péptido está limitado por las interacciones del surco de unión en los extremos N y C, mientras que para el HLA-II, cada extremo del péptido puede sobresalir del surco de unión (41,49).

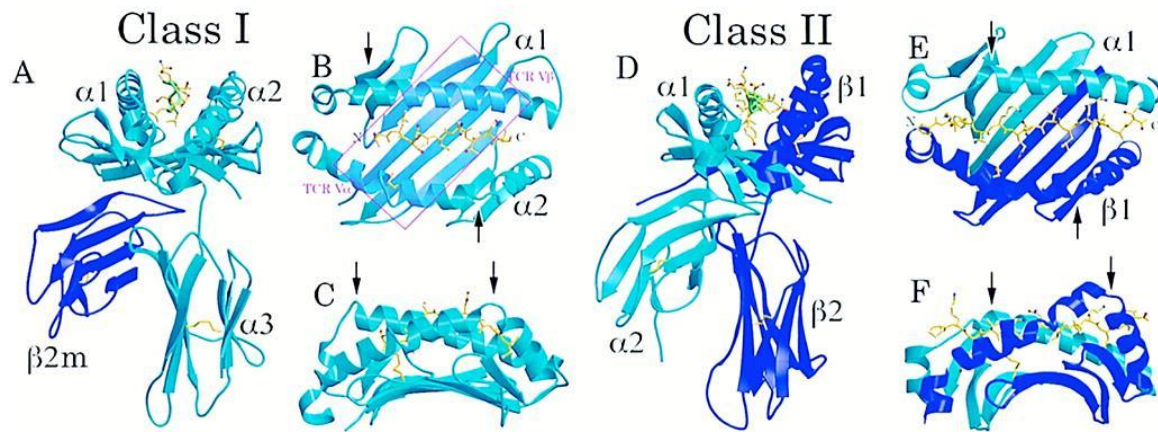


Fig 2. Modelos moleculares de moléculas HLA de clase I (A – C) y clase II (D – F). A, los dominios clase I α_1 , α_2 y α_3 se muestran (azul claro) en asociación no covalente con la molécula β_2m . Las cadenas β anti-paralelas interactúan para formar hojas β . Las hélices α en los dominios α_1 y α_2 forman los lados y el piso de un surco que se une a los péptidos antigénicos procesados (amarillo). B, vista desde arriba de los dominios α_1 y α_2 que muestran el péptido antigénico en un complejo molecular para el reconocimiento por el TCR de una célula T CD8⁺ (sitio de reconocimiento delineado por un rectángulo rosa). C, vista lateral de los dominios α_1 y α_2 que resaltan los puntos de contacto TCR tanto en las hélices α como en el péptido antigénico. D, vista lateral de la molécula HLA clase II que muestra la cadena α (azul claro) y la cadena β (azul oscuro). En la proteína de clase II, el surco de unión al péptido está formado por hélices α en los dominios α_1 y β_1 y una hoja β formada de nuevo por los dominios α_1 y β_1 . E, vista desde arriba tanto del α_1 como del β_1 . Los dominios y el fragmento peptídico antigénico procesado tal como serían vistos por el TCR de una célula T CD4⁺. F, vista lateral que resalta los dominios α_1 y β_1 y el péptido antigénico. Tomado de: Chaplin DD. Overview of immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:41.(104)

3.4. PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS

3.4.1. Procesamiento péptidos clase I

El análisis por espectrometría de masas del péptido unido a MHC Clase I ha revelado que la población de péptidos unidos contiene al menos 1.000 especies diferentes (50), la mayor parte de estos péptidos presenta aproximadamente 100 copias por célula, aunque su población es estructuralmente diversa, los péptidos unidos usualmente muestran una distribución de longitud estrecha que abarca 8-11 aminoácidos. Datos cristalográficos han demostrado que estas variables agrupaciones de cadenas laterales de aminoácidos forman bolsas dentro del surco de unión del péptido y definen un microentorno específico de alelo para péptidos unidos. Los bolsillos a lo largo del surco pueden contener o anclar cadenas laterales de aminoácidos predominantes del péptido en la molécula de Clase I (51).

El ensamblaje de una cadena pesada, una microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2m$) y un péptido en el retículo endoplásmico (ER) da como resultado la expresión de una molécula HLA Clase I en la superficie celular (52). La ruta de procesamiento del HLA-I está orientada en gran medida a la presentación de antígenos endógenos encontrados en el citoplasma, el núcleo y las mitocondrias de la mayoría de los tipos de células, tales antígenos se trasladan al ER en forma de péptidos derivados de la proteólisis, donde se encuentran y pueden ensamblarse con moléculas HLA-I recién sintetizadas (52).

Una vez que se han generado los péptidos, tienen que obtener acceso a las moléculas de HLA clase I que están esperando los péptidos en el ER para eso el transportador asociado con el procesamiento de péptidos (TAP) una proteína dimerica especializada en la translocación de péptidos oligoméricos y en el bombeo de estos péptidos citosólicos a la luz del ER, también actúa como una plataforma para el plegamiento de moléculas MHC de clase I al unirse a una o más moléculas de tapasin una chaperona de MHC clase I (53).

TAP no se encuentra en la cara de la envoltura nuclear, así que, los péptidos primero deben degradarse en el citosol para llegar al retículo endoplasmático, en donde las moléculas HLA de clase I están parcialmente plegadas y estabilizadas por dos chaperonas comunes adicionales, calreticulín (CTR) y el chaperón ERp57 (34), este último ayuda al plegamiento de las glicoproteínas recién sintetizadas en el RE mediante la isomerización del enlace disulfuro, su especificidad para las glicoproteínas se debe a su capacidad para asociarse a través de su dominio β con CTR, una segunda chaperona tipo lectina, calnexina (CNX) y posiblemente por la chaperona de unión al péptido la proteína disulfuro isomerasa (PDI). La calreticulina es una lectina que se une por glicosilación dando como resultado una interacción más estable entre las moléculas y tapasin. El complejo TAP, tapasin, HLA de clase I, ERp57 y calreticulina CRT se llama el complejo de carga de péptidos (PLC) (34).

Un sofisticado mecanismo de "control de calidad" denominado dislocación que se basa en el estado de los oligosacáridos unidos a extremo N en la cadena α evita la

exportación de trímeros de péptidos de cadena $\alpha / \beta_2m /$ péptido ensamblados de forma incompleta. Los precursores de estos péptidos se generan en el citosol principalmente a partir de productos de traducción incompletos, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) que están parcialmente degradados por el proteasoma, pero también pueden incluir otras proteínas mal plegadas o proteínas retrotranslocadas del ER, escindidas por el proteasoma u otras proteasas citosólicas (54).

Otro componente luminal del ER que es de importancia crítica para la generación adecuada de complejos de MHC-I-péptido es una aminopeptidasa 1 asociada a ER (ERAP1). Los péptidos asociados con MHC-I generalmente tienen una longitud de 8-10 aminoácidos, pero el complejo TAP puede trasladar los péptidos al RE que son significativamente más largos estos péptidos pueden recortarse en el extremo amino en el RE por ERAAP / ERAP1 para producir péptidos de la longitud apropiada para la unión de MHC-I. Un cambio estructural requerido para la escisión que solo puede ser inducido por un péptido más largo evita que ERAP1 "sobrecargue" los péptidos translocados con TAP a una longitud que eliminaría su capacidad para unirse a MHC-I (55).

Los proteasomas están involucrados en muchas funciones celulares, la más importante es la generación de péptidos para presentación por MHC Clase I de moléculas y vigilancia de células T. Este es el componente central del sistema ubiquitina-proteasoma, que es el principal sistema de degradación de proteínas dependiente de ATP en las células, dicho sistema está compuesto por un cilindro con núcleo, que tiene actividad de proteasa y dos tapas que se organizan como una partícula cilíndrica que contiene cuatro anillos heptaméricos apilados, que delimitan la cámara catalítica donde las proteínas se degradan (55). Los dos anillos internos están formados por siete subunidades β ($\beta_1 - \beta_7$), y los dos anillos externos están formados por siete subunidades α ($\alpha_1 - \alpha_7$). Tres subunidades β (β_1, β_2 y β_5) son catalíticamente activas en proteasomas de vertebrados e inician la escisión de los enlaces peptídicos en las proteínas. Se han descrito dos proteasomas "alternativos": el inmunoproteasoma, que es

expresado por muchas células inmunes y el proteasoma específico del timo, que se expresa en células epiteliales del timo (TECs) (56).

La entrada de proteínas en la cámara catalítica está estrechamente regulada. De hecho, el poro estrecho formado por el anillo α se obstruye aún más por las colas N-terminales de estas subunidades α , esto impide la entrada de proteínas plegadas en la cámara del proteasoma y, por lo tanto, protege a las células de la degradación perjudicial de las proteínas (57). Luego, los péptidos se trasladan a la luz del RE mediante transportadores TAP 1/2 y se recortan en su extremo N por proteasas denominadas ERAAP. La transferencia de los péptidos recortados del TAP al MHC-I plegable se promueve mediante un "complejo de carga", compuesto por una serie de chaperonas solubles y unidas a membrana incluidas la CNX, ERP57 y CRT. Una vez ensamblados, los complejos MHC-I / $\beta 2m$ / se exportan desde el retículo endoplasmático a través de la vía secretora clásica y se expresan en la membrana plasmática, es allí donde la carga de moléculas MHC-I por péptidos producidos de manera endógena desempeña un papel crítico en la destrucción de células infectadas por virus, células tumorales y células alogénicas transplantadas por los linfocitos T citotóxicos CD8 + efector (CTL) (57).

Las células inmunes variantes o de timus de las subunidades proteolíticas se incorporan en el barril 20S, y esto altera el patrón de degradación del proteasoma induciendo el estrés inmune y la exposición a $IFN\gamma$ para conducir a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden causar el plegamiento incorrecto de proteínas lo que les permite manejar el conjunto expandido de sustratos y prevenir la agregación de proteínas. Por lo tanto, en lugar de ser más selectivos en la fabricación de péptidos para la presentación de MHC de clase I, los inmunoproteasomas pueden funcionar para manejar un conjunto de sustrato de proteína expandida, lo que resulta en la producción de más péptidos (58).

El PLC asegura una carga eficiente de péptidos en moléculas de clase I después de unirse a un péptido de suficiente afinidad, el MHC clase I se libera de las chaperonas y puede pasar el sistema de control de calidad, para la expresión en la membrana

plasmática mientras TAP transloca péptidos de entre 8 y 16 aminoácidos en el retículo endoplasmico, estos péptidos pueden requerir un recorte adicional antes de unirse a las moléculas MHC de clase I (59).

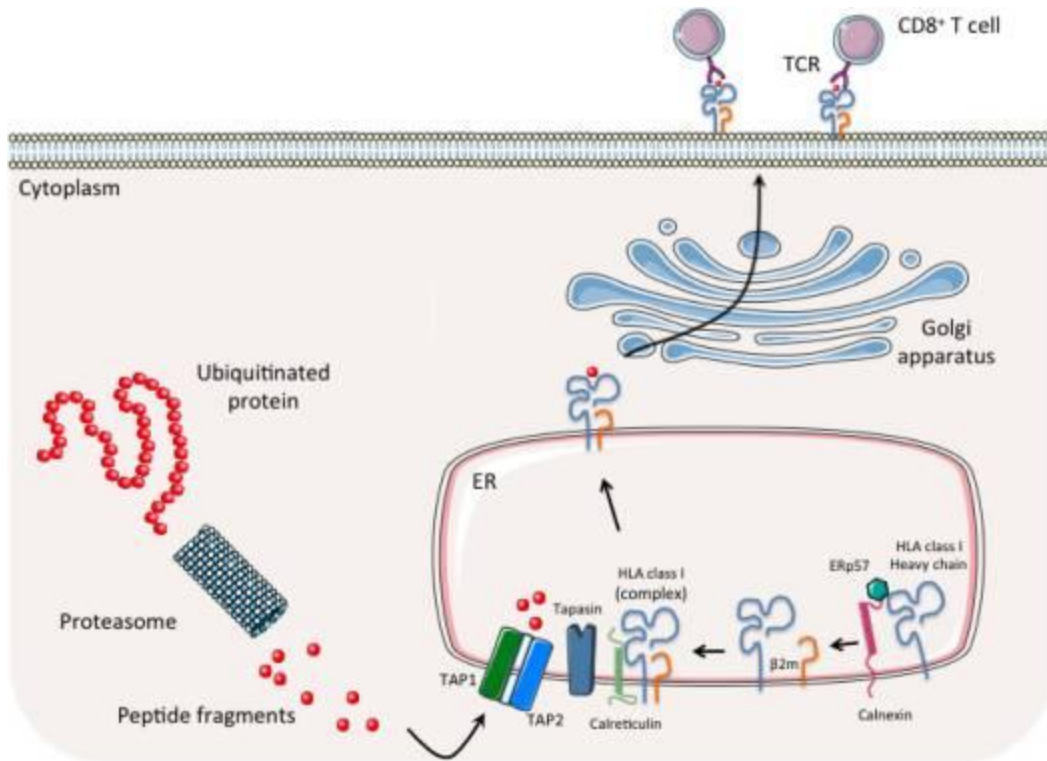


Fig 3. Vía de presentación del antígeno MHC clase I. Tomado de: Concha F, Srivastava R, Ferrone S, Robert L. *Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells.* 2017;52–8 (60).

Como ERAAP no forma parte del PLC, muchos péptidos deben recortarse fuera del PLC en el lumen ER y luego volver a ingresar al PLC para unirse a las moléculas MHC de clase I, este probablemente recorta los péptidos a una longitud mínima de 8 aminoácidos, lo que aún es adecuado para la carga de MHC clase I, cuando estos péptidos no encuentran las moléculas de clase I de MHC, son eliminados por la vía ERAD y reingresan al citosol para su destrucción o una nueva ronda de translocación TAP y consideración HLA clase I (61,62).

3.4.2. Procesamiento de péptidos por HLA-II

Las proteínas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad son glicoproteínas transmembrana, heterodiméricas de aproximadamente 50 kDa que constituyen una parte crítica de la respuesta inmune adaptativa a patógenos extraños. Las proteínas MHCII se expresan mediante las llamadas células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas, los macrófagos y las células B, en las cuales se unen a péptidos derivados de proteínas propias y extrañas y las muestran en la superficie celular para la interacción con las células T CD4⁺. Las subunidades α y β de HLAII recién sintetizadas se trasladan a la luz del ER, allí se asocian con una proteína chaperona trimérica conocida como la cadena invariante o cadena I asociada a MHC de clase II (63).

La cadena I es una glucoproteína transmembrana de tipo II no polimórfica y no codificada en el MHC. Existen varias formas de cadena I debido al empalme alternativo y al uso de codones de inicio alternativos. La liberación de la cadena I se inicia por proteólisis progresiva en endosomas ácidos. Esto culmina en un péptido extendido de manera variable de aproximadamente 20 residuos que está asociado con el surco de unión HLA-II (64). Este se denomina (CLIP), péptido de cadena invariante asociado a la clase II. Hay algunos alelos HLA-II con una baja afinidad por CLIP y están asociados genéticamente con el desarrollo de la autoinmunidad. Esto puede reflejar un papel de los complejos MHC-II-CLIP en la regulación de la selección tímica, el sesgo de la diferenciación del subconjunto de células T auxiliares. Alternativamente, la liberación prematura de CLIP a partir de estos alelos MHC-II asociados con la enfermedad puede favorecer la selección de epítomos de autoantígenos o la captura de auto-péptidos dentro de compartimentos endosómicos distintos (64).

Las moléculas MHC-II están compuestas por dos cadenas integrales de membrana, α y β , ambas codificadas dentro del MHC. El sitio de unión al péptido comprende los dominios distales de membrana de ambas cadenas. La asociación de las cadenas α y β nacientes con la cadena invariante (también llamada Ii o CD74) en el ER facilita el ensamblaje del MHC-II y la salida del ER. Una porción de Ii, llamada CLIP ocupa la

hendidura de unión al péptido del heterodímero α / β , que ocluye el sitio de unión del péptido y evita la unión prematura de los péptidos. Después de la unión del péptido, los dímeros de heterodímeros α / β sufren un cambio conformacional que aumenta la estabilidad, inhibe la agregación y mejora su transporte a la superficie de la célula (65,66).

Enfocada en el entorno extracelular, la vía de presentación de antígenos HLA- II se cruza con la vía endocítica para muestrear antígenos. El antígeno extracelular es captado por las APC y exportado en un compartimento delimitado por la membrana, conocido como el fagosoma que tiene un pH de 4 a 4,5. Este compartimento fagosómico sufre una serie de modificaciones, en parte dictadas por su contenido, y finalmente se fusiona con los lisosomas para formar fagolisosomas, este compartimiento interactúa con las moléculas del HLA de clase II (67).

La carga de péptidos en las moléculas HLA-II puede ocurrir en múltiples compartimentos de la vía endocítica. La mayoría de las moléculas MHC-II recién sintetizadas probablemente se carguen en las vías endosomales tardías, mientras que los dímeros α , β de HLA-II internalizados de la superficie celular pueden ser "recargados" con péptidos dentro del sistema endosomal temprano. Las moléculas de HLA de clase II se asocian durante su ensamblaje en el ER con la cadena invariante Ii que actúa como un pseudopéptido completando el surco de unión al péptido de clase II (68,69).

En un compartimento comúnmente llamado MIIC, las moléculas HLA-II se encuentran con los fragmentos antigénicos generados por las proteasas residentes. Para que estos péptidos se unan a las moléculas MHC II, la cadena invariante tiene que degradarse por la misma mezcla de proteasas, especialmente la catepsina L y S. Esto deja un fragmento de cadena invariable (llamado CLIP) inaccesible para las proteasas y permanece en el sitio de unión al péptido de las moléculas MHC II. Este fragmento de CLIP debe intercambiarse por péptidos de mayor afinidad con la ayuda de un chaperona similar a HLA clase II HLA-DM (70).

La estructura de HLA-DM en asociación con MHC-II (HLA-DR1) revela que la DM abre localmente el surco para liberar péptidos de baja afinidad, como el CLIP. Después de una cierta residencia en MIIC, las moléculas de MHC de clase II se mueven a la membrana plasmática a través del transporte vesicular o en forma de túbulos. Dado que la información de direccionamiento en la cadena invariante se ha eliminado después de su degradación en MIIC, las moléculas MHC II pueden residir de manera estable en la membrana plasmática (71).

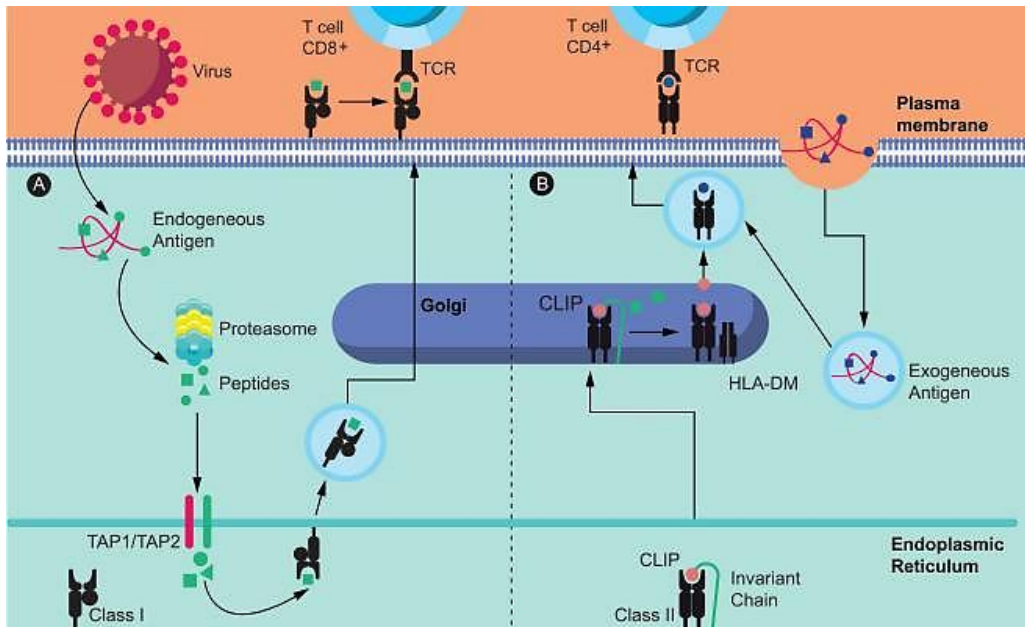


Fig 4. Vías de presentación del antígeno HLA clase I y clase II. Tomado de: Castiblanco J, Anaya J-M. *Genetics and Vaccines in the Era of Personalized Medicine. Curr Genomics. 2015;16(1):47–59 (72).*

La descomposición de las proteínas endocitadas en la vía de procesamiento de antígenos exógenos se inicia mediante una variedad de proteasas que normalmente se asocian con los lisosomas. Las enzimas lisosomales, como las catepsinas pueden descomponer las proteínas en oligopéptidos de aproximadamente 12 a 20 residuos de longitud (73). El hecho de que la gran mayoría de los auto-péptidos unidos a las moléculas de HLA Clase II se deriva de las glicoproteínas transmembrana, demuestra que el catabolismo de las moléculas asociadas a la membrana en el reciclaje de vesículas endocíticas es un paso clave en la generación del repertorio peptídico de moléculas HLA-II. Una posible ruta para la presentación de proteínas citosólicas por el MHC de clase II puede ser a través de la vacuola autofágica. La autofagia permite el

engrosamiento de grandes porciones de citoplasma e incluso puede incluir orgánulos, como las mitocondrias (73).

La presentación cruzada por MHC-I es un proceso distintivo en el que los antígenos de partículas fagocitadas o proteínas solubles internalizadas por otros medios se ensamblan con MHC-I (74). El procesamiento de antígenos exógenos en la vía de la clase I del HLA podría atacar potencialmente células de tejido no infectadas que endocitan residuos virales, para destrucción por CTLs específicos de virus. Por lo tanto, células dendríticas (DCs) han sido otorgadas con una propiedad especializada que les permite presentar antígenos derivados de otras células, para la estimulación de CTLs (75).

3.5. HLA-B*27 Y ASOCIACIÓN CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE

En mapeo de HLA-B, se determinó que este gen de clase I es el más polimórfico en el cromosoma 6 y en el genoma humano. El HLA-B*27 tiene un alto grado de polimorfismo genético, con 105 subtipos conocidos, del HLA-B*27:01 al HLA-B*27:106, codificado por 132 alelos. Este resultado es concordante con la base de datos HLA IPD-IMGT / HLA (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>), que enumera HLA-B como el gen MHC más polimórfico, con 511 genotipos conocidos (76).

Se han descrito varias hipótesis de la asociación del B*27 con la enfermedad, la teoría de los péptidos artritogénicos sugiere que la enfermedad se debe a la capacidad de B*27 para unirse y presentar péptidos artritogénicos únicos a los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8. Por lo tanto, una respuesta CTL restringida a B*27, desencadenada reconocimiento de forma cruzada de un auto-péptido o péptidos unidos a HLA-B*27. La teoría del plegamiento incorrecto postula que la acumulación de B*27 HC en el retículo endoplásmico, proporciona estimulación potente y crónica de la respuesta al estrés ER contribuyendo a la producción de citoquinas inflamatorias. El plegamiento incorrecto de HLA-B*27 que ocurre en el intestino de los pacientes con EA y la enfermedad de Crohn y se acompaña de la activación de la autofagia que parece estar asociada con la modulación de IL-23 en AS. La hipótesis del B*27-libre de HC y homodímero propone que la enfermedad resulta del reconocimiento inmune de la

superficie aberrantemente plegada de moléculas B27 (77) . En la tabla 1 describe las espondiloartritis asociadas a HLA-B*27.

Tabla 1. Espondiloartritis asociadas a HLA-B*27.

Enfermedad	Características clínicas	Frecuencia aproximada HLA-B*27 (%)
Espondilitis anquilosante	Inflamación y formación de hueso nuevo en las articulaciones sacroilíacas y espinales.	94 (OR 171)
Artritis reactiva	Artritis articular no aséptica después de ciertas infecciones bacterianas gastrointestinales o genitourinarias.	30-75
Colitis asociada a espondiloartritis	Artritis sacroilíaca, espinal y articular grande asociada con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.	33-75
Espondiloartritis psoriásica	Artritis sacroilíaca, espinal y articular grande asociada con psoriasis cutánea.	40-50
Artritis relacionada con entesitis juvenil	Artritis articular asociada con entesitis, generalmente en niños adolescentes.	76
Uveítis anterior aguda	Inflamación estéril aguda de la cámara anterior del ojo.	50

Tomado de: Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, Leo P, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. Nat Genet. 2015;45(7):730–8 (78).

La asociación entre la barrera del daño como la dermis y la mucosa del intestino con la posterior exposición del sistema inmune a los microorganismos patógenos puede ser de relevante en la patogenia. Considerable superposición entre los loci de susceptibilidad de la espondilitis anquilosante y los loci inflamatorios de la enfermedad intestinal se ha encontrado (79).

Hay tres características principales de HLA-B27 que son conocidas aparte de pertenecer a moléculas de HLA clase I. Estas incluyen especificidad de unión peptídica, una tendencia a plegarse lentamente y una predilección por formar homodímeros de cadena pesada durante el reciclaje de la superficie celular (80).

La enfermedad suele comenzar en la tercera década de la vida, y alrededor de 5 años antes en pacientes positivos que en pacientes negativo para B*27. Existe mayor prevalencia de pacientes con espondilitis anquilosante en hombres en comparación con mujeres (la proporción aproximada de hombre a mujer es de 2 a 3: 1). Las cifras de la prevalencia precisa son difíciles de obtener para la espondiloartritis axial, porque los estudios se basan en una selección de pacientes o encuestas basadas en la población que generalmente no incluyen investigaciones de imagen y pruebas HLA-B27. La prevalencia de espondilitis anquilosante refleja la prevalencia de HLA-B27 en una población dada (81).

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. UNIVERSO, POBLACIÓN, MUESTRA

4.1.1. Tipo de investigación

Estudio retrospectivo, descriptivo no experimental en un periodo comprendido entre los años 2015 al 2018 en individuos sanos.

4.1.2. Población

Resultados de tipificación HLA-B en individuos sanos remitidos al laboratorio de Inmunología del Hospital Militar Central desde el año 2015 al 2018 con solicitud de tipificación HLA-B, por sistema molecular SSO- LUMINEX IS 100/200.

4.1.3. Muestra

Resultados de tipificación HLA-B por sistema molecular SSO- LUMINEX IS 100/200 de 255 individuos sanos en quienes se descartó sintomatología articular de espondiloartritis.

4.1.4. Selección de la muestra

No probabilística, por conveniencia.

4.1.5. Criterios de inclusión

4.1.5.1. Criterios de inclusión para frecuencia de HLA-B

Resultados de la tipificación HLA-B de sujetos que cumplan con las condiciones para establecer frecuencias alélicas y genotípicas.

4.1.5.2. Criterios de inclusión para frecuencia de HLA-B*27

Resultados de individuos HLA-B*27 positivos sin signos, síntomas o diagnóstico de enfermedades reumáticas autoinmunes.

4.1.6. Criterios de Exclusión

4.1.6.1. Criterios de exclusión para frecuencia de HLA-B

Resultados de Individuos con signos, síntomas o diagnóstico de enfermedad reumática o neoplásica. Solicitudes y resultados por otra técnica diferente a SSO para HLA o resultados inconclusos.

4.1.6.2. Criterios de exclusión para frecuencia de B27

Resultados de individuos B*27 positivos con signos, síntomas o diagnóstico de enfermedad reumática.

- Síntomas periféricos: talalgia, artralgia y artritis periférica: hombros, manos, rodillas, poliartralgias.
- Síntomas extraarticulares: ojo seco, dolor ocular, xeroftalmía, xerostomía y otros órganos extraarticulares.
- Síntomas axiales: dolor en la columna vertebral, rigidez, dolor en los glúteos, dolor de espalda, dolor en la cadera, sacroilitis.

4.1.7. Análisis de tipificación de antígeno HLA-B

El procedimiento de tipificación HLA-SSO, se realizó mediante el método molecular basado en hibridación de sondas SSO del ADN monocatenario obtenido a partir de reacción en cadena de la polimerasa-PCR, reconociendo el polimorfismo del segundo y tercer exón del gen de HLA clase I, analizadas en un sistema LUMINEX IS 100/200 que permite su medición con alta sensibilidad. El procesamiento de las muestras se realizó por el laboratorio de inmunología del Hospital Militar Central.

La secuenciación de alta resolución tiene como finalidad la determinación del orden de nucleótidos en un oligonucleótido de DNA empleando métodos y técnicas bioquímicas, se realizó como prueba confirmatoria en tres muestras HLA-B*27 positivo, dos de individuos sanos y una de un paciente con diagnóstico de espondilitis Anquilosante como control.

4.1.8. Análisis estadístico

Todos los datos se registraron en una base de Excel y se analizaron mediante el programa SPSS V24 (Windows). Se obtuvieron las frecuencias (n (%)) para las variables demográficas y frecuencias genéticas. Se realizó Chi² y test exacto de Fisher para el análisis en variables categóricas demográficas con respecto a la presencia de HLA-B y específicamente HLA-B27. Todas las pruebas se hicieron con un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0.05$).

4.2. HIPÓTESIS

Existen genotipos, alelos y haplotipos con frecuencias similares a las de otras poblaciones en una muestra de 255 individuos sanos colombianos.

4.3. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Para el cumplimiento de los objetivos se analizaron los resultados de la tipificación HLA- A, B, C, DR de individuos sin clínica sugestiva de enfermedad reumática.

4.3.1. Extracción de DNA

Se realizó aislamiento de ADN genómico a partir de sangre total recolectada en tubos con anticoagulante (EDTA) y con posterior centrifugación utilizando el Kit Wizard® Genomic DNA Purification de Promega.

Lisis de glóbulos rojos

Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos

nucleicos se liberen, para esto, se utilizan soluciones básicas o detergentes que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN (82).

1. Para 300µl de volumen de muestra se agregó 900 µl de solución de lisis celular a un tubo de centrifuga estéril de 1.5ml.
2. Se transfirió la muestra al tubo que contiene la solución de lisis celular, invirtiendo el tubo 5–6 veces para mezclar.
3. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente (invirtiéndola de 2 a 3 veces una vez durante la incubación) para lisar los glóbulos rojos, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente.
4. Se descartó la mayor cantidad posible de sobrenadante sin alterar el sedimento blanco visible (aproximadamente de 10 a 20µl de líquido residual permanecerán en el tubo de 1.5ml).
5. Se resuspendieron completamente los glóbulos blancos para obtener una lisis celular eficiente.

Lisis de núcleos y precipitación de proteínas

En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Se utiliza la tendencia hidrofílica que tienen los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos. La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación lo que permite aislar al ADN.

6. Se adicionó 300µl de la solución de lisis nuclear al tubo que contiene las células resuspendidas. Se pipetea la solución de 5 a 6 veces para lisar los glóbulos blancos obteniéndose una solución que debe ser muy viscosa.
7. Se agregó 1,5µl de la solución de RNasa al lisado nuclear, y se mezcló la muestra invirtiendo el tubo 2 a 5 veces. Se incubó la mezcla a 37°C durante 15 minutos y se dejó a temperatura ambiente.
8. Se adicionó 300µl de la solución de precipitación proteica al lisado nuclear, y se agitó en vórtice durante 10 a 20 segundos.
9. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (una bolita de proteína de color marrón oscuro debe ser visible).

Precipitación y Rehidratación de ADN

En la precipitación se utilizan soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble (82).

10. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5ml que contenía 300µl de etanol al 70% a temperatura ambiente.
11. Se mezcló la solución suavemente por inversión hasta que las hebras blancas de ADN formaron una masa visible.
12. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente (el ADN será visible como una pequeña bolita blanca).
13. Se decantó el sobrenadante y se agregó de nuevo 300µl de etanol al 70% a temperatura ambiente, invirtiendo suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN y los lados del tubo de microcentrífuga. Se centrifugó como en el paso 12.
14. Se aspiró cuidadosamente el etanol con una pipeta Pasteur estéril, el pellet de ADN está muy suelto en este punto y se debe tener cuidado para evitar aspirar el pellet en la pipeta, posteriormente invierta el tubo en papel absorbente limpio y seque al aire el pellet durante 10 a 15 minutos.
15. Se agregó 100µl de la solución de rehidratación de ADN al tubo y se incubó a 65°C durante 1 hora mezclando periódicamente la solución.
16. Se Almacenó el ADN entre 2 y 8°C para su posterior cuantificación.

4.3.2. Cuantificación

Para la cuantificación de DNA se utilizó el equipo NANODROP 2000c Spectrophotometer el cual permite realizar medidas espectrofotométricas en un amplio rango de longitudes de onda (220-750 nm) con gran exactitud y reproducibilidad. Funciona mediante la combinación de tecnología de fibra óptica y propiedades naturales de tensión superficial para capturar y retener cantidades mínimas de muestra, se requiere un volumen de muestra de 1-2 µl y gracias a su pequeño tamaño y fácil manejo permite medir un gran número de muestras en poco tiempo.

En los espectrofotómetros NanoDrop el extremo superior es de una fibra óptica conectada a una fuente de emisión de Xenon. Ambas partes definen un preciso y estrecho paso óptico cuya longitud varía automáticamente con la concentración de la muestra, permitiendo hacer mediciones en un rango muy amplio de concentraciones sin hacer diluciones. Esta característica lo hace idóneo para determinar la concentración y pureza de los ácidos.

Como primer paso se limpió las superficies ópticas con 2 a 3µL de agua desionizada. El blanco del equipo se realizó dispensando 1µL de tampón en la superficie óptica inferior. Para la medición se seleccionó la constante de concentración DNA-50 y posteriormente se depositó 1µL de muestra de ácido nucleico en el pedestal óptico inferior, el software calculó automáticamente la concentración de ácido nucleico y las relaciones de pureza, que se correlacionaron con la gráfica espectral. La calidad de la muestra se evaluó analizando las relaciones 260/280 y 260/230 cuyo resultado aproximado fue de 1.8 y 2.0 respectivamente.

4.3.3. Amplificación por PCR-SSO

El DNA diana se amplifica por PCR utilizando cebadores específicos de grupo biotinilados y empleando una única reacción de PCR para cada locus HLA, con el kit LIFECODES HLA-B SSO Typing kit.

1. Se preparó la master mix con las siguientes condiciones:

Tabla 2. Volúmenes para PCR-SSO

Reactivo	Volumen por reacción de PRC
Agua grado biología Molecular	8.8µl
Master mix	5µl
Taq polimerasa	0.2µl
DNA Genómico	5µl (concentración final 20ng/µl)
Volumen Total	20µl

2. Se adicionaron 15µl de la mezcla prepara a tubos de PCR.

3. Se adicionaron 10µl de ADN de cada muestra a un tubo y 5µl de Agua destilada como control negativo.
4. Se corrieron las muestras en el termociclador con el programa de amplificación:
 - 95°C por 3 minutos12 ciclos: 95°C por 15 segundos
 - 60°C por 30 segundos
 - 72°C por 30 segundos28 ciclos: 95°C por 10 segundos
 - 63°C por 30 segundos
 - 72°C por 30 segundos28 ciclos: 72°C por 2 minutos

4.3.4. Hibridación

La hibridación se realizó en placas de 96 pozos con el producto de la PCR-SSO y con microesferas acopladas a sondas de los alelos HLA.

1. Se calentó la mezcla de sondas a 55°-60°C por 5-10 minutos.
2. Se adicionaron 15µl de la mezcla de sondas dentro de las placas Costar®, (dándole vortex a la mezcla de sondas cada 8 pozos) junto con 5µl del producto específico de PCR a cada pozo, cubriendo la placa con el sello de polietileno.
3. Se colocó en el termociclador y se corrió con el programa de hibridación:
 - 97°C por 2 minutos
 - 47°C por 10 minutos
 - 56°C por 8 minutos
 - 56°C HOLD
4. Se realizó la mezcla de 170µl de la solución de dilución con 0.85µl de Streptavidina-PE por muestra (mantener la mezcla en la oscuridad).
5. En el paso 56°C HOLD, se adicionaron a cada muestra 170µl de la mezcla de solución de dilución/Streptavidina-PE, sin parar el programa y sin retirar la placa del termociclador.

Cada una de las distintas sondas puede ser complementaria de una secuencia exclusiva de un alelo o grupo de alelos, es decir, estas sondas son diseñadas para que cada una de ellas hibride con una región complementaria que puede estar presente o no en el ADN amplificado. El análisis de los resultados de la tipificación con SSO puede aplicarse para determinar la presencia o ausencia de secuencias concretas de ADN en el producto amplificado y para identificar los posibles alelos en la muestra.

4.3.5. Tipificación HLA-B27 por técnica de Luminex IS 100/200

En desarrollo de ensayos de fase sólida como Luminex utiliza microesferas de poliestireno impregnadas con una única mezcla de dos tinciones fluorescentes que son simultáneamente excitadas por un láser rojo a 365 nm. La detección HLA es lograda usando un conjugado de anticuerpo secundario con un fluoróforo, R-ficoeritrina, el cual es excitado por un láser verde (532 nm) y detectado a 576 nm.

Un analizador de flujo identifica la intensidad de fluorescencia SAPE en cada microesfera. El software se utiliza para asignar reacciones positivas o negativas basadas en la intensidad de la señal fluorescente. La asignación de la tipificación HLA se basa en reacciones de sondas positivas y negativas.

Una vez se retiraron las placas del termociclador se leyeron las muestras en el fluoroanalizador para obtener los respectivos resultados.

4.3.6. Secuenciación HLA de alta resolución

La secuenciación de alta resolución es un método molecular basado en plataformas de microarrays que están diseñadas para detectar secuencias génicas de sitios o regiones predefinidos. Los resultados dependen de la calidad del alineamiento y ensamblaje ya que las secuencias alineadas incorrectamente pueden producir falsos positivos, mientras que las secuencias no alineadas pueden ser fuente de falsos negativos. La secuenciación tiene el potencial de detectar cualquier tipo de variante genómica en un único experimento, evitando algunos inconvenientes inherentes de los ensayos de genotipado actuales.

La preparación de la biblioteca de muestras de ADN para la secuenciación generalmente comienza con la fragmentación aleatoria del ADN genómico. Los adaptadores de oligonucleótidos específicos de la plataforma se ligan luego a los extremos que envuelven los fragmentos para permitir su posterior amplificación y secuenciación con cebadores comunes. Las bibliotecas se secuencian masivamente y en paralelo con un secuenciador, las lecturas se alinean con secuencias de referencia o se ensamblan de novo. La tecnología de alta resolución permite el descubrimiento de nuevos SNP, indels y variaciones estructurales, permitiendo un extenso análisis de las variaciones genéticas.

5. RESULTADOS

5.1. Descripción de la muestra:

Se analizaron retrospectivamente 255 individuos sanos con solicitud de tipificación HLA- B, correspondientes a hombres en un 50.6% y mujeres en un 49.4%. El rango de edad predominante fue de 19 a 45 años con 57.1%, seguido por los mayores de 45 años con 33.1% y los pertenecientes al grupo de 0–18 años con el 9.6%. La solicitud del HLA-B predominó por el servicio de Reumatología con 35.7% seguido del servicio de oftalmología con 12,5% y otros servicios comprendidos por neurología, hematología, fisiatría y gastroenterología con el 7.05%. El 44.7% de los individuos eran donantes que pertenecieron a estudios de compatibilidad y el 55.3% fueron individuos con solicitud a quienes se les descarto síntomas compatibles con el diagnóstico de EAS o enfermedad reumática (Tabla 2).

Tabla 3. Análisis Demográfico

		n	%
AÑO	2015	29	11.4%
	2016	72	28.2%
	2017	55	21.6%
	2018	99	38.8%
EDAD	0-18 años	23	9.6%
	19-45 años	136	57.1%
	> 45 años	79	33.1%

GENERO	Femenino	126	49.4%
	Masculino	129	50.6%
PROCEDENCIA	Norte de la costa pacífica y la Isla de san Andrés	0	0%
	Región Andina Central, región Amazónica, región Orinoquia	134	80.24%
	Suroeste de la región Andina y la costa del Caribe	33	18.56%
SERVICIO	Reumatología	91	35.7%
	Oftalmología	32	12.5%
	Otros	18	7.05%
	No aplica	114	44.7%
TIPO DE INDIVIDUO	Donante	114	44.7%
	Paciente	141	55.3%

Tomándose el sitio de origen de la mayoría de individuos los departamentos con mayor número de participantes en el estudio fueron Cundinamarca con 76 (59 pertenecen a la ciudad de Bogotá), seguido por Antioquía, Cauca, Córdoba y Tolima con 10 individuos cada uno, 59 individuos se reparten en los departamentos con menor frecuencia de participación los cuales fueron Atlántico, Bolívar, Boyacá, Caldas, Guajira, Guaviare, Huila, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Quindío, Risaralda, Santander y Valle.

La distribución geográfica se realizó como la propuesta por el Dr. Paredes y col. en el 2003, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Colombia (83), quien estableció 4 grupos para la correspondiente distribución: 1. Norte de la costa Pacífica y la isla de San Andrés, 2. región andina central, región amazónica y región Orinoquia, 4. El suroeste de la región andina y la costa Caribe. El 80.24% de las solicitudes provenían de las región andina, la región amazónica y territorios orientales, que corresponden a los departamentos de Antioquia, Boyacá, Caldas, Caquetá, Cundinamarca, Guaviare, Huila,

Meta, Norte de Santander, Putumayo, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima. Continuos a estos los provenientes del suroeste de la región andina Valle del Cauca, Cauca y Nariño y la Costa Caribe con los departamentos de Córdoba, Bolívar, Cesar, Guajira, Magdalena, Atlántico con un 18.56%. No sé registraron individuos de la zona norte de la costa Pacífica ni de la isla de San Andrés en el presente estudio.

5.2. Frecuencia Genotípica del HLA-B

Se establecieron 27 genotipos HLA-B de 255 sujetos sanos, como se presenta en la (tabla 3) (Grafico 1). Los genotipos más frecuentes fueron, B*35 con el 48.23% de frecuencia; el 1.96% de estos individuos son homocigotos para el genotipo B*35 y el alelo más prevalente fue el B*350101 con 13.72% de frecuencia. El segundo genotipo de mayor frecuencia fue el B*40 con el 19.60% de frecuencia y su alelo más común fue el B*400201 con el 12.94% de frecuencia, seguido por el genotipo B* 44 con el 17.25% de frecuencia, el 0.39% de estos fueron homocigotos para el genotipo, siendo su alelo más frecuente el B*440301 con un 10.58% de frecuencia, por último el genotipo B*14 con una frecuencia del 13.72% con el alelo B*140201 como más prevalente con frecuencia del 9.80%. El genotipo menos frecuente fue B*47 (0.39%).

Tabla 4. Frecuencias Genotípicas HLA-B

Frecuencia Genotípica		
B*	n	%
35	123	48.23
40	50	19.60
44	44	17.25
14	35	13.72
39	29	11.37
7	28	10.98
15	23	9.01
51	19	7.45
38	16	6.27
53	14	5.49
27	13	5.09
49	13	5.09
18	12	4.70

41	12	4.70
48	11	4.31
8	11	4.31
55	8	3.13
50	8	3.13
13	7	2.74
57	6	2.35
52	6	2.35
58	7	2.74
45	5	1.96
42	5	1.96
37	2	0.78
56	2	0.78
47	1	0.39

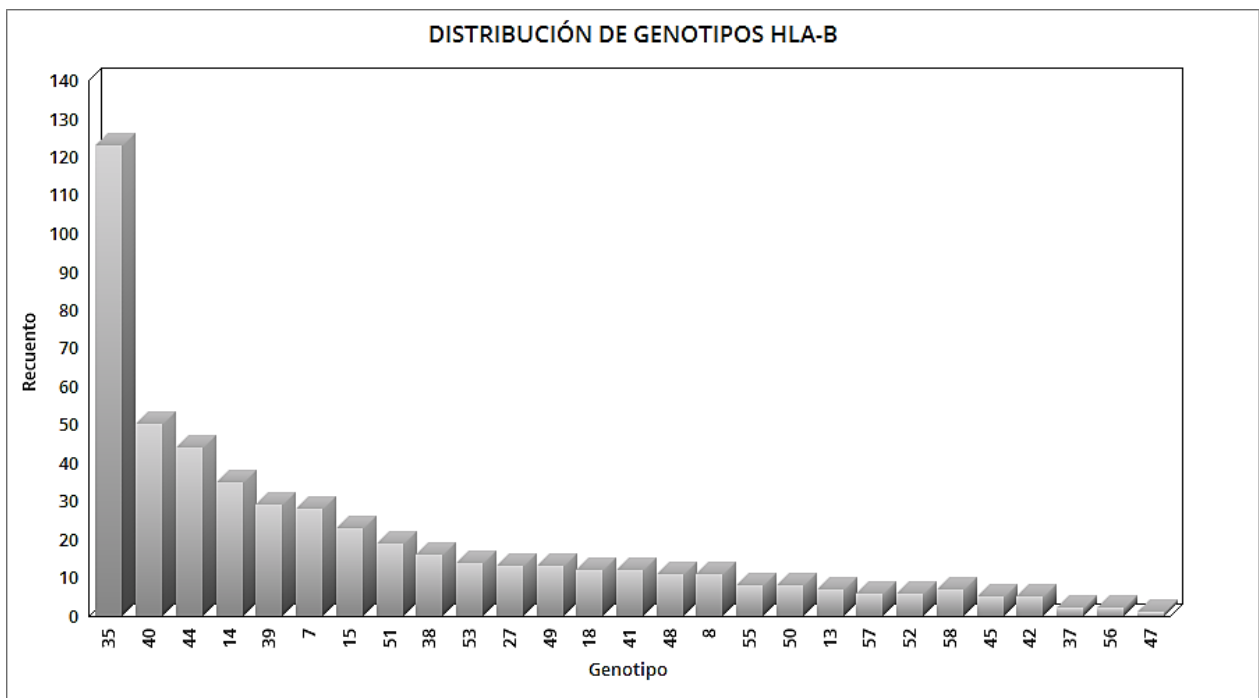


Fig 5. Distribución de genotipos HLA-B

Se definieron las asociaciones de los genotipos B*35, B*40, B*44 y B*7 con el género y la procedencia de los sujetos, solo se encontró asociación estadísticamente significativa con el genotipo B*7 y el género femenino con un valor $P=0.008$.

5.3. Frecuencia alélica del HLA-B

De los 255 individuos se registraron 510 datos encontrando 89 alelos HLA-B, los más frecuentes fueron B*35:01:01 (6.7%), B*40:02:01 (6.5), B*35:43:01 (5.3%), B*44:03:01 (5.1%), B*07:02:01 (4.7%), B*14:02:01 (4.3%), B*39:01:01 (3.5%), B*44:02:01 (3.3%) (Tabla 4) (Grafico 2).

En menor frecuencia se encontraron los alelos B*08:56, B*15:46, B*35:01, B*35:17, B*35:31, B*37:01, B*40:01, B*40:37, B*56:01 con 0.4% y los alelos B*07:02:02, B*14:02, B*14:02:02, B*14:54, B*15:10:01, B*15:16:01, B*18:57, B*35:01:08, B*35:10, B*35:15:01, B*35:25, B*35:42:01, B*35:43, B*38:04:01, B*40:04, B*40:11:01, B*40:157, B*40:201, B*41:01, B*41:15, B*42:02:01, B*44:27:01, B*47:01:01, B*48:01, B*49:01, B*51:01, B*51:01:17, B*51:10, B*51:148, B*52:01:02, B*52:01:05, B*52:09, B*53:01, B*57:03:01, B*58:02:01 con un 0.2% de frecuencia.

Tabla 5. Frecuencias alélicas HLA-B

HLA-B*	Frecuencia	
	n	%
350101	34	6.7
400201	33	6.5
354301	27	5.3
440301	26	5.1
070201	24	4.7
140201	22	4.3
390101	18	3.5
440201	17	3.3
510101	16	3.1
380101	15	2.9
2703/05/17	13	2.5
530101	13	2.5
490101	12	2.4
180101	11	2.2
351201	11	2.2
140101	10	2.0
150101	10	2.0
480101	10	2.0
080101	9	1.8

350501	8	1.6
550101	8	1.6
130201	7	1.4
3531	7	1.4
410201	7	1.4
500101	7	1.4
580101	6	1.2
151701	5	1.0
350201	5	1.0
352001	5	1.0
400102	5	1.0
450101	5	1.0
570101	5	1.0
150301	4	0.8

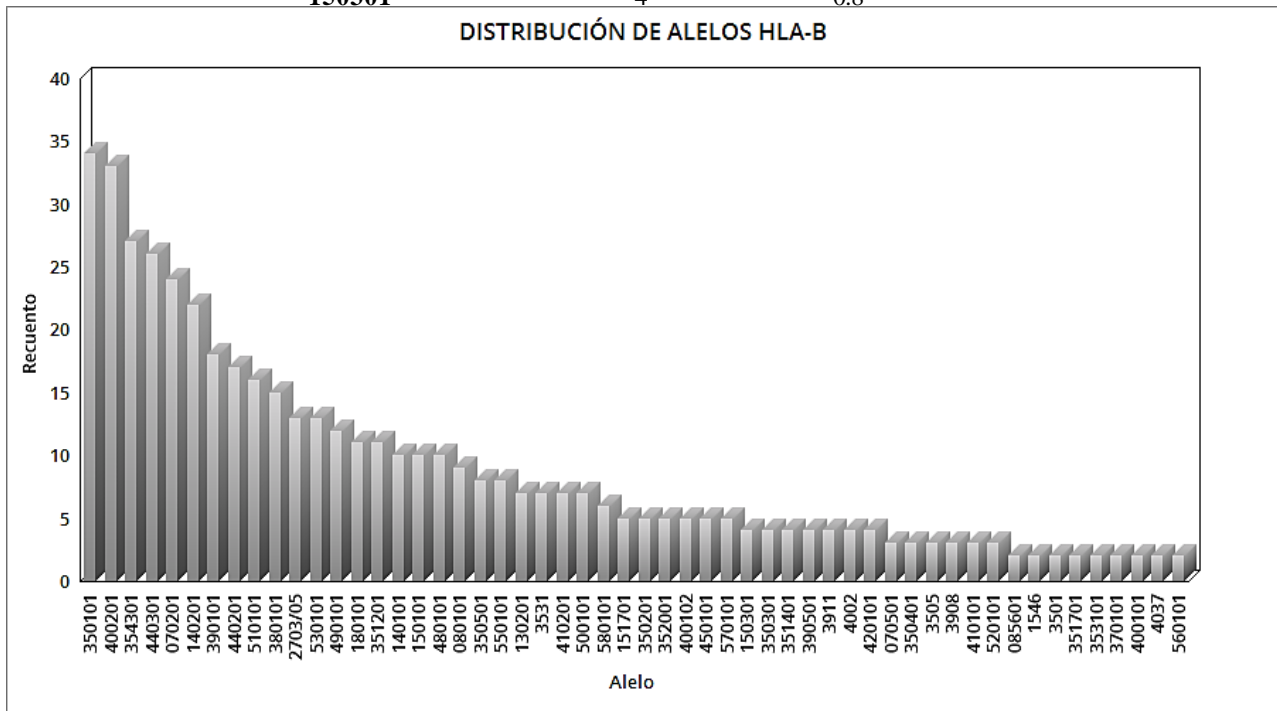


Fig 6. Distribución de alelos HLA-B

Se determinaron las asociaciones de los alelos B*3501, B*4002, B*4403 y B*0702 con el género y la procedencia de los individuos, se encontró asociación estadísticamente significativa del alelo B*0702 con el género femenino obteniendo un valor $P=0.008$.

Se analizaron los alelos B*070201, el B*350101 y el B*400201 y se establecieron las parejas de alelos B. Los alelos más comunes para B*070201 con sus respectivas frecuencias fueron B*0702-B*3543 (21.4%) y B*0702-B*3501 (14.3%), para el alelo B*350101 fueron B*3501- B*4002 (20.6%) y B*3501-B*0702 (11.8%), en el alelo B*400201 se encontró B*4002-B*3501 (21.2%) y B*4002-B* 4801 (9.1%).

Tabla 6. Distribución de genotipos y alelos por departamentos

DEPARTAMENTO	NÚMERO DE GENOTIPOS	NÚMERO DE ALELOS	n
ANTIOQUIA	9	10	10
ATLÁNTICO	2	2	2
BOGOTÁ D.C.	21	43	59
BOLIVAR	3	4	3
BOYACÁ	10	11	8
CALDAS	2	2	1
CAQUETÁ	4	4	4
CAUCA	7	12	10
CESAR	6	6	3
CÓRDOBA	3	3	10
CUNDINAMARCA	17	24	17
GUAJIRA	2	2	1
GUAVIARE	2	3	2
HUILA	7	8	4
MAGDALENA	4	4	2
META	9	14	6
NARIÑO	4	4	2

NORTE DE SANTANDER	6	7	4
PUTUMAYO	3	4	2
QUINDÍO	3	3	2
RISARALDA	4	4	2
SANTANDER	5	5	3
TOLIMA	12	16	10
VALLE	11	13	8

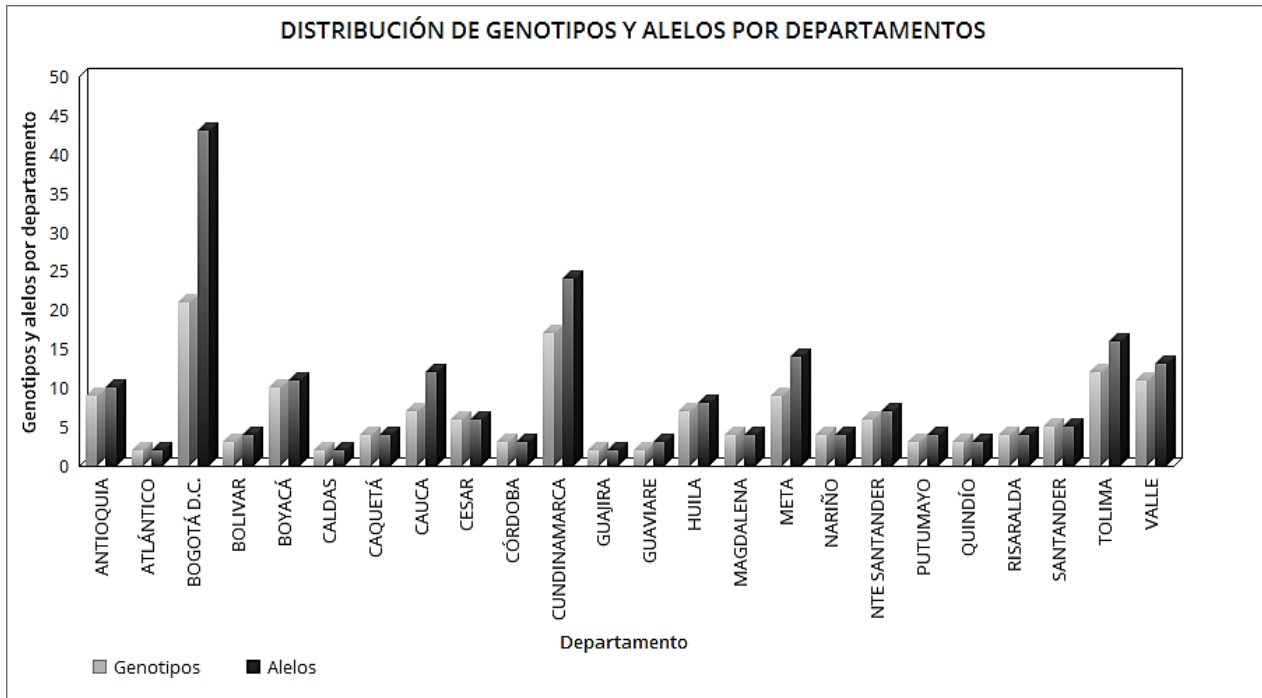


Fig 7. Distribución de genotipos y alelos por departamento

5.4. Frecuencia Haplótipica

Se determinaron 355 haplotipos en los 255 individuos. En la tabla 5 Se muestran los haplotipos con frecuencias mayores e iguales a 0.78%, siendo los más frecuentes A*02:01B*35:05DRB*04:07 y A*24:02B*40:02DRB*14:02 con el 1.96% de frecuencia, seguidos por A*02:01B*14:02DRB*01:01 y A*03:01B*07:02DRB*04:07 con el 1.57% de frecuencia.

Tabla 5. Frecuencias Haplóticas ABDR

HAPLOTIPO	n	%
A*02:01B*35:05DRB*04:07	5	1.96

A*24:02B*40:02DRB*14:02	5	1.96
A*02:01B*14:02DRB*01:01	4	1.57
A*03:01B*07:02DRB*04:07	4	1.57
A*03:01B*35:12DRB*16:12	3	1.18
A*02:01B*18:01DRB*03:01	3	1.18
A*24:02B*35:01DRB*08:01	3	1.18
A*24:02B*35:43DRB*04:07	3	1.18
A*02:01B*07:02DRB*01:03	2	0.78
A*02:01B*15:01DRB*04:07	2	0.78
A*02:01B*15:17DRB*11:02	2	0.78
A*02:01B*35:43DRB*04:07	2	0.78
A*02:01B*39:01DRB*04:04	2	0.78
A*02:01B*40:02DRB*04:03	2	0.78
A*02:01B*41:02DRB*04:01	2	0.78
A*02:04B*44:02DRB*01:03	2	0.78
A*03:01B*35:01DRB*01:01	2	0.78
A*11:01B*07:02DRB*12:01	2	0.78
A*24:02B*14:02DRB*01:01	2	0.78
A*24:02B*15:46DRB*08:02	2	0.78
A*02:01B*35:05DRB*14:02	2	0.78
A*11:01B*51:01DRB*04:03	2	0.78
A*24:02B*15:01DRB*15:01	2	0.78
A*24:02B*35:43DRB*13:01	2	0.78
A*24:02B*35:43DRB*15:01	2	0.78
A*24:02B*51:01DRB*16:02	2	0.78
A*26:05B*48:01DRB*13:03	2	0.78
A*31:01B*40:02DRB*16:01	2	0.78
A*33:01B*44:03DRB*04:07	2	0.78
A*68:01B*39:01DRB*08:02	2	0.78
A*68:02B*53:01DRB*01:02	2	0.78

5.5. Frecuencia HLA-B*27

De los 255 datos recolectados 13 sujetos fueron positivos para el antígeno HLA-B*27 que corresponde a una frecuencia genotípica del 5% y una frecuencia alélica del 2.5%. Con una frecuencia del género masculino con el 53.89% en comparación a la proporción de género femenino 46.1%. La tabla 6 describe las características generales de la población HLA B27 positivo y la asociación con el género, la edad y procedencia. Cuatro de estos individuos

pertenecen al departamento de Cundinamarca, dos al departamento de Antioquia, dos al departamento de Boyacá y uno al Cesar. No se encontraron individuos homocigotos para el alelo B*27.

Tabla 6. Distribución por edad y género en individuos HLA-B*27 positivos

		Positivos HLA-B*27		
		n	%	valor P
RANGO DE EDAD	0-18 años	1	7.6%	
	19-45 años	7	53.8%	0.900
	> 45 años	3	23.0%	
GENERO	Femenino	6	46.1%	0.809
	Masculino	7	53.8%	
PROCEDENCIA	Norte de la costa pacífica y la Isla de san Andrés	1	7.69%	0.905
	Región Andina Central, región Amazónica, región	8	61.53%	

Se realizó la asociación entre la edad, el género y la procedencia de los individuos con el alelo HLA-B*27 positivo, sin encontrar valores estadísticamente significativos. Sin embargo, se encontró mayor frecuencia en el género masculino de 53.8%, además, el 61.53% de los individuos son nativos de la región andina central, región amazónica y región Orinoquia. En la tabla 7 se describen los haplotipos encontrados de los individuos positivos para el alelo HLA-B*27.

Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación realizada en dos individuos sanos con el alelo B*27 positivo fue B*27:05:02G y en el paciente control con diagnóstico de espondilitis anquilosante fue B*27:05:02G (ver anexo 9.1).

Tabla 7. Haplotipos ABDR para HLA-B*27:03/05 positivos

Haplotipos de individuos B*27:03/05

A*02:01-B*27:03/05-DRB*04:03
A*23:01-B*27:03/05-DRB*04:01
A*24:02-B*27:03/05-DRB*01:01
A*02:01-B*27:03/05-DRB*04:02
A*02:01-B*27:03/05-DRB*08:01
A*11:01-B*27:03/05-DRB*01:01
A*03:01-B*27:03/05-DRB*15:01
A*30:02-B*27:03/05-BRB*07:01
A*30:02-B*27:03/05-DRB*13:01

6. DISCUSIÓN

Los genes que codifican para el sistema HLA son polimórficos por lo cual son los más estudiados dentro del genoma humano. El conocimiento de los alelos HLA que se expresan con mayor frecuencia en una población es el elemento central en la comprensión de mecanismos asociados a susceptibilidad o resistencia de múltiples enfermedades. De hecho en las enfermedades hereditarias, la respuesta inmune dirigida contra antígenos propios es crucial en la etiopatogenia de la enfermedad (84,85). La distribución y frecuencia de los antígenos HLA varían entre los diferentes grupos étnicos. Se ha postulado que esta diversidad de polimorfismo HLA ha evolucionado bajo una presión selectiva única en diferentes áreas geográficas. Esto podría estar relacionado con el papel de las moléculas de HLA en la presentación de agentes infecciosos prevalentes en las diferentes áreas del mundo (43).

La tecnología Luminex ha estado disponible durante muchos años y se usa principalmente para discriminar entre los diferentes alelos de antígenos leucocitarios humanos (HLA). Consiste en una técnica de multiplexación de perlas de poliestireno, combinando una técnica de citometría de flujo con dos láseres. Es más sensible para la detección de anticuerpos anti-HLA que otras técnicas utilizadas, como la linfocitotoxicidad dependiente del complemento (LCT), la técnica Elisa o la citometría de flujo (86,87).

Según cifras del DANE en el censo general del año 2005, la población colombiana se divide en cuatro grupos principales de herencia: mestizo, definido como una mezcla racial entre nativos americanos, africanos y europeos con 35 millones (84.16%), nativo americano con 1.4 millones (3.36%), afrocolombiano con 4,3 millones (10,40%) y Romaní con

alrededor de 5000 individuos (0,01%). En nuestro estudio la población está comprendida por un 80.24% de individuos pertenecientes a la zona Andina, Amazónica y Orinoquia, el 43.4% de sujetos proceden de Cundinamarca, zona central del país en donde se registra un alto número de migración desde las zonas rurales y de la periferia del país causada por fenómenos sociopolíticos. En el 2018 se censaron 42.8 millones de personas, 48.6 % hombres y el 51.4% mujeres, es decir en el país residen 95 hombres por cada 100 mujeres, en nuestra muestra el 49.4% son mujeres y el 50.6% son hombres (88).

En nuestra investigación se determinaron 27 genotipos HLA-B, las frecuencias genotípicas más altas fueron B*35 (48.23%), B*40 (19.60%), B*44 (17.25%), B*14 (13.72%), B*39 (11.37%), seguidos por B*7, B*15, B*51, B*38, B*53, B*27, B*49 con frecuencias mayores o iguales al 5%, el que presentó menor frecuencia fue el B*47 (0.39%), estos alelos son concordantes con los descritos en la población general de Colombia.

En poblaciones nativas de Colombia se tiene estudios como el desarrollado en una población original de San Basilio de Palenque al norte del país, en donde los genotipos B*15, B*35 y el B*51 fueron los más frecuentes (89). Por otro lado, un reporte de frecuencias HLA fue realizado en Jaidukama, una población aislada de Colombia, ubicada cerca de la ciudad Ituango en Antioquía, sus resultados establecieron los genotipos B*35, B*51, B*39 y B*40 como los más frecuentes (90), igualmente, en indígenas wayú, en la península de la Guajira el estudio alélico determinó como más frecuentes los genotipos B*15, B*35 y B*39 (91). El genotipo B*35 se encuentra frecuentemente al igual que en nuestros resultados, con la diferencia que en individuos nativos presenta polimorfismo limitado mientras que en poblaciones caucásicas muestra una alta variabilidad (92).

Analizando estos resultados se concluye que las frecuencias genotípicas varían de una población a la otra, estas son poblaciones aisladas y con fuerte identidad cultural que se pueden caracterizar, identificar y diferenciar genéticamente de otras poblaciones, ya que el nivel de endogamia es mayor y la inmigración se ve disminuida por el difícil acceso, de hecho se han reportado genes HLA autóctonos, especialmente de clase II (2).

En población general Bermeo y colaboradores obtuvieron 28 genotipos HLA-B en 200 individuos pertenecientes al departamento del Huila, siendo el B*35 y el B*44 los más comunes con una frecuencias más bajas que las nuestras del 15.58% y del 10.38% respectivamente, el B*40 fue el tercero más común para esta población con una frecuencia baja del 7.79% ya que en nuestros resultados el B*40 obtuvo 18.82 siendo el segundo más frecuente, seguidos por B*51, B*14, B*15 con frecuencias mayores o iguales al 5% más bajas que las reportadas en nuestra muestra. Los genotipos menos frecuentes para esta región fueron B*37, B*59 y el B*78 con frecuencia del 0.32%, así mismo, establecieron los alelos B*59 y el B*78 con frecuencia de 0,32% para ambos alelos (2).

En Medellín, en 926 donantes observaron 43 alelos HLA-B, el genotipo B*35 obtuvo una frecuencia más baja comparada con la nuestra (17.8%) sin embargo fue el más común, seguido por el B*44 que obtuvo una frecuencia del 9.1% que comparada con la nuestra es más baja, además, los genotipos B*18, B*51, B*61, B*65, B*39, B*07, B*60, y B*08, con frecuencias mayores o iguales a 3% frecuencias similares a las estimadas en nuestra muestra. En menor frecuencia se presentaron B*67, B*75, B*81 con 0.1% diferentes a nuestros genotipos menos frecuentes. En este artículo identifican con otros alelos como el B*17, B*46, B*59, B*60, B*61, B*62, B*63, B*64, B*65, B*67, B*70, B*71, B*72, B*75, B*78, B*81 con frecuencias menores al 3% (12).

En los departamentos del Valle del Cauca, Cauca, Chocó y Nariño se determinaron 29 genotipos en una muestra de 1230 donantes, registrando prevalencia el genotipo B*35 (17.7%), B*40 (10.5%) y B*44 (9.5%) que comparados con nuestros resultados las frecuencias fueron más bajas, sin embargo a igual manera que nuestro estudio, fueron los genotipos más frecuentes, con menos frecuencia encontraron el B*56, B*78 y B*81 con 0.1%, estos dos últimos no se expresaron en nuestros resultados (3). La población de Barranquilla puede ser un buen modelo para estudiar la mezcla de población actual en América del Sur. Al igual que nuestro estudio los genotipos B*35 y el B*44 son los más comunes con 17.0% y 10.6% respectivamente (31).

Nuestros resultados coinciden con estudios de la zona norte, centro y sur del país permitiendo establecer el genotipo B*35 como el más frecuente con una frecuencia aproximada de 17.8% en toda la población colombiana. Las frecuencias genotípicas son obtenidas asumiendo que los miembros de la población se reproducen al azar y que los principales mecanismos de evolución como las mutaciones y la selección natural no han ejercido una presión definitiva que lleve a cambios trascendentales en el comportamiento de los genes en la población (15). Así mismo se espera que esas frecuencias mantengan el equilibrio de ligamiento debido al grado de repoblamiento de las zonas analizadas.

Con respecto a los reportes de frecuencias genotípicas de otros lugares, por ejemplo las establecidas por Álvarez y col. en población uruguaya, el B*35 obtuvo frecuencia más baja que la nuestra 25.3% al igual que para el genotipo B*44 (23.1%), sin embargo, fueron los más prevalentes, igualmente, en Argentina los genotipos B*35, B*44 se registraron como los más comunes con frecuencias de 14.6% y 11.3%, respectivamente, en este mismo país se establecieron frecuencias con individuos nativos encontrando que el B*35 es el único genotipo presente en todas las provincias con una frecuencia superior o igual al 15%, mientras que B*62, B*60, B*51, B*39, B*44, B*7 y B*8 mostraron frecuencias entre el 4 y el 8% que comparadas con las reportadas en nuestros estudios son similares (20,93,94). En Cuba, el análisis de frecuencia génica reportó los genotipos B*35 (9.7%) y B*44 (9.33%) con una frecuencia elevada (14).

La relación entre Uruguay y Argentina revela un origen común europeo con importantes componentes españoles e italianos. Sin embargo, la presencia de algunos genotipos y alelos comúnmente encontrados en africanos e indios americanos revela una mezcla en la población. Esto muestra que al igual que otras poblaciones latinoamericanas mezcladas, como la colombiana, la población uruguaya recibió contribuciones de los ancestros europeos, indios americanos nativos y africanos. Por lo tanto, la amplia heterogeneidad de los orígenes puede haber contribuido al nivel de diferenciación genética entre las poblaciones sudamericanas, mostrando procesos complejos de mezcla de genes (94). Por otro lado, en Cuba aproximadamente el 60% de la población es de ascendencia mixta europea e india (30).

Los alelos más frecuentes en los 255 individuos analizados con un total de 89 alelos fueron B*35:01:01 (6.7%), B*40:02:01 (6.5%), B*35:43:01 (5.3%), B*44:03:01 (5.1%), B*07:02:01 (4.7%), B*14:02:01 (4.3%) B*39:01:01 (3.5%), B*44:02:01 (3.3%), B*51:01:01 (3.1%).

Para el análisis de las frecuencias alélicas se tomó como referencia el reciente análisis realizado a partir de 1463 unidades de sangre de cordón en Bogotá, en el cual se encontraron un total de 98 diferentes alelos donde los alelos más frecuentes fueron B*35:43 (8.65%), B*40:02 (8.44%), B*44:03 (5.6%), B*51:01 (5.64%), B*14:02 (4.0%) y B*07:02 (4.99%) que comparado con nuestras frecuencias establecidas son similares y también son los más frecuentes en nuestra muestra, además, utilizaron secuenciación de alta resolución (32).

Así mismo, las frecuencias establecidas en otros lugares del país como en Medellín arrojan a los alelos B*35:35 (4,8%), B*35:44 (3,8%), B*35:61 (2,4%) y B*35:51 (2,3%) como los más frecuentes. En el Valle del Cauca, Cauca, Chocó y Nariño los alelos con las frecuencias más elevadas fueron B*35:40 (4.7%), B*35:44 (2.9%), B*35:51 (2.5%). En el Huila el B*35:40 obtuvo una frecuencia del 5,7%, seguido por el B*35:44, B*40:44, B*35:48 con frecuencia del 3.8% para cada genotipo (2). Igualmente, son frecuencias similares a las establecidas en los 255 sujetos y son los alelos con frecuencias más elevadas.

El desplazamiento armado en Colombia ha sido desde la década de los años noventa, la consecuencia más visible del conflicto armado insurgente, contrainsurgente y paraestatal. Entre 1985 y 2013 de acuerdo con las estimaciones de la consultoría para los derechos humanos y el desplazamiento (CODHES), una cantidad de 5.921.924 de individuos se han visto en necesidad de desplazarse para proteger su vida e integridad y la de sus familias. Esto significa, de acuerdo con las estimaciones mundiales de Internal Displacement Monitoring Centre, Colombia es el segundo país en el mundo con mayor número de desplazamientos internos (95). Lo que se convierte en un factor fundamental de mezcla

poblacional con consecuencias en las frecuencias génicas y alélicas del HLA en la población.

En Cuba el alelo B*58:01 obtuvo una frecuencia de 3.51%, seguido de B*08:01 con 2.32% siendo los más frecuentes, en la ciudad de Managua, Nicaragua el alelo más prevalente fue el B*40:02 (10.3%) (14,30). Williams y colaboradores analizaron la distribución del HLA-B en seis poblaciones diversas: brasileña, mexicana (serie y mestizos), cubana (caucasoide y mulata), sudafricana zulú, omaní y china de Singapur el análisis condujo a la detección del alelos B*35:01 y B*44:03 presente en todas las poblaciones y posiblemente representa un alelo ancestral (18).

En Francia un estudio de donantes de médula ósea estableció frecuencias alélicas encontrando a los alelos B*07:02 (11.37%), B*08:01 (9,53%), B*44:03 (8,01%) más frecuentes, por el contrario el alelo B*07:02 y B*08:01 en nuestras frecuencias no son relevantes. Al norte de este país se establecieron los alelos de migrantes del norte de África encontrando el B*51:01 (8.02%) y B*50:01 (6.95%) (21,96).

Establecimos la frecuencia haplotípica, encontrando 31 haplotipos de los cuales los más comunes fueron el A*02:01-B*35:05-DRB*04:07 y A*24:02B*40:02-DRB*14:02 con 1.96% de frecuencia para cada uno. En amerindios wayu los haplotipos más frecuentes son A*24-B*51-DRB1*0403-DQB1*0302 (8.5%), A*2-B*15-DRB1*1602-DQB1*0301 (5.4%) y A*2-B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 (4.3%) (91). Comprados con el estudio realizado en Bogotá donde reportaron 1439 haplotipos diferentes en donde el haplotipo más frecuente es A*24:02- B*35:43-C*01:02-DRB1*04:07-DQB1*03:02 con una frecuencia del 4.14% , estos haplotipos no son idénticos a los establecidos en nuestros resultados por ende sus frecuencia son diferentes (32).

Los genes HLA-B no son específicos de una población, sin embargo, cuenta con numerosas variantes alélicas, localizadas en un segmento cromosómico de componente ancestral europeo, africano y americano nativo. Cabe mencionar que aunque los resultados de este estudio están de acuerdo con lo encontrado en otras poblaciones, la distribución de

las frecuencias génicas y haplotípicas fue diferente en algunos casos, lo cual evidencia la variación a nivel interpoblación que puede existir.

Se registraron 13 individuos B*27 positivos y sin ninguna sintomatología asociada a artropatías, de ellos el 53.8% fueron hombres y el 46.1% mujeres. La frecuencia genotípica fue del 5%, mientras la frecuencia alélica fue del 2.5% comparado con otros estudios desarrollados en población general de Colombia la frecuencia alélica se encuentra inferior con 1.47% (84,97) y con el realizado en Bogotá la frecuencia alélica es de 1.36% así como en Medellín con una frecuencia alélica del 1.4% (12), además, los subtipos reportados fueron B*27:02 (0.24%), B*27:03 (0,03%), B*27:05 (1.06%), B*27:07 (0.03%) con sus respectivas frecuencias (32).

La secuenciación de las tres muestras seleccionadas dos de individuos sanos y una de paciente con diagnóstico de espondilitis anquilosante nos permitió dar un indicio sobre el B*2705, como el más frecuente en la población. Además, que la metodología de mediana resolución como es luminex tiene sus limitaciones para definir el subtipo pero nos da el dato que aporta a la clasificación actual de las espondiloartritis como es la positividad del HLA B27.

Se cree que el B*2705 es un subtipo ancestral, su prevalencia y distribución podrían haber sido influenciadas por factores ambientales como la malaria endémica, que podría haber proporcionado una selección genética negativa. Los subtipos más comúnmente asociados a la espondilitis anquilosante son B*27:05 en los caucásicos, B*27:04 en asiáticos y B*27:02 en poblaciones mediterráneas (98). Curiosamente, la frecuencia del alelo B*27 en algunas poblaciones indígenas del mundo no tiene una distribución uniforme (99). Por ejemplo, en indígenas wayu el B*27 obtuvo una frecuencia alélica del 1.0%, sin embargo, en estudios en población de san Bacilio Palenque no se detectó el alelo B*27, al igual que con comunidades indígenas de Jaidukama y chimila (90,91,100).

En otros países como Argentina el B*27 presenta una frecuencia genotípica del 2.23%, en Uruguay tiene una frecuencia alélica del 2.9% y genotípica del 5.9% concordante con las

frecuencias establecidas en este proyecto. En Francia obtuvo el subtipo B*2705 obtuvo una frecuencia de 2.8% y en los Coreanos se establecieron los genotipos B*27:04, B*27:05, B*27:20 y B*27:24 con frecuencias de 20.2%, 249.2%, 6.0% y 0.5% respectivamente. En Mongolia, Zhang y col. evaluaron HLA-B en dos pueblos del interior de la Región Autónoma de Mongolia de China y dentro de los genotipos se encontró el B*27 con frecuencia genotípicas en Oroqen del 4.72% y Ewenkiuna del 1.02% concluyendo que las poblaciones del mismo grupo lingüístico y que residen en la misma área geográfica difieren la una de la otra (22,96,101).

Savran y colaboradores, establecieron Subtipos HLA-B*27 en un grupo control de 55 individuos positivos, elegidos al azar de 2112 donantes de médula ósea turcos, sanos y no relacionados. Los subtipos encontrados fueron B*27:01, B*27:02, B*27:05, B*27:07, B*27:08, siendo el más común B*27:05 con una frecuencia del 42.86% (7). Akassou determino la prevalencia del B*27 en 128 controles sanos marroquíes, con frecuencia del 4.7%, en este estudio se asoció más al género femenino, con una edad que oscila entre los 45 y los 55 (102). La baja frecuencia de B*27 en la población general colombiana dificulta el análisis Para de los subtipos de B*27 (103).

7. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados y el análisis del trabajo de investigación realizado, se establece los genotipos B*35, B*40 y B*44, los alelo B*35:01, B*40:02 y B*35:43 y los haplotipos A*02:01B*35:05DRB*04:07 y A*24:02B*40:02DRB*14:02 como los más frecuentes en la población colombiana, concluyendo que el tamaño de la muestra es representativo ya que los resultados concuerdan con los publicados en Colombia y Latinoamérica principalmente.

A pesar de que las asociaciones no hayan sido estadísticamente significativas se podría pensar que el lugar de procedencia de los individuos influye en la expresión de los alelos HLA. Por otra parte, se corrobora la mezcla racial y repoblamiento existente en nuestra población.

Así mismo, la frecuencia genotípica y alélica del B*27 en individuos sin signos ni síntomas asociados a enfermedades inflamatorias que corresponde a una frecuencia genotípica del 5% y una frecuencia alélica del 2.5%. Así mismo, no tiene asociación al género, edad o procedencia de los sujetos.

La realización de este estudio nos permitió conocer nuestras frecuencias génicas, alélicas y haplotípicas en individuos sanos, información de gran utilidad para estudios antropogenéticos, en el cálculo de la probabilidad de encontrar un donante compatible para determinado receptor y en asociaciones entre HLA y diferentes enfermedades. Además de conocer las limitaciones y ventajas de técnicas moleculares de mediana y alta resolución, implementadas en el laboratorio clínico actualmente.

8. RECOMENDACIONES

Se espera la respectiva publicación de un artículo que incluya las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas del HLA clase I y clase II con el desarrollo de tecnología de mediana resolución que sirva para la consolidación de un perfil genético poblacional sana colombiana. Así mismo, se recomienda el desarrollo de las mismas frecuencias con una tecnología molecular de alta resolución.

9. REFERENCIAS

1. Abbas A k, Lichtman AH, Pillai shiv. Inmología celular y molecular. 8va ed. España: Elsevier saunders; 2015. 110–130 p.
2. Bermeo S, Guerra MT, Alfonso HO. Frecuencias de HLA-A, B y DRB1 en una población de Huila-Colombia. *Rev Fac Salud - RFS*. 2015;2(1):9–19.
3. Arrunategui AM, Villegas A, Ocampo LÁ, Rodríguez LM, Badih A. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II en donantes de una población del suroccidente colombiano. *Acta Medica Colomb* [Internet]. 2013;38(1):16–21.
4. Ossa H, Aquino J, Pereira R, Ibarra A, Ossa RH, Pérez LA, et al. Outlining the ancestry landscape of Colombian admixed populations. *PLoS One*. 2016;11(10):1–15.
5. López de Castro JA. HLA-B27 y patogenia de las espondiloartropatías. *Reumatol Clínica*. 2009;3:S24–8.
6. OMS C de N de la. IPD-IMGT / HLA [Internet]. IPD-IMGT / HLA. 2019.
7. Oguz FS, Ocal L, Diler AS, Ozkul H, Asicioglu F, Kasapoglu E, et al. HLA B-27 subtypes in turkish patients with spondyloarthropathy and healthy controls. *Dis Markers*. 2004;20(6):309–12.
8. Sanchez-Mazas A, Nunes JM, Middleton D, Sauter J, Buhler S, McCabe A, et al. Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: A catalogue from the European Federation for Immunogenetics. *HLA*. 2017;89(2):104–13.
9. Martínez Julio, Navarrete Ana, Arrazola Araceli, Suárez América Z-NA, Camargo Adolfo , García Beatriz RR, Ambriz Raúl JJ. Subtipos de HLA-B27 en familias de pacientes mestizos mexicanos con espondilitis anquilosante. *Asoc Mex Med Transfusional, AC* [Internet]. 2008;1(1):18–22.
10. Chila M L, Romero Sánchez C, Gómez G A, Casas M, Bautista Molano W, Maldonado Z, et al. Métodos para la identificación del antígeno de histocompatibilidad HLA-B27: comparación de cuatro protocolos técnicos. *Rev Med* [Internet]. 2015;23(1):22.
11. Duangchanchot M, Puapairoj C, Romphruk A, Kongmaroeng C, Leelayuwat C,

- Romphruk A V. HLA-B*27 subtypes in Northern and Northeastern Thais, Karens, and Bamars determined by a high-resolution PCR-SSP technique. *Tissue Antigens*. 2009;73(6):590–4.
12. Rodríguez LM, Giraldo MC, García N, Velásquez L, París SC, Álvarez CM, et al. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos, Medellín, Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2007;27(4):537.
 13. Pozzi S, Longo A, Ferrara GB. HLA-B locus sequence-based typing. *Tissue Antigens*. 1999;53(3):275–81.
 14. Paradoa ML, Middleton D, Acosta A, Sarmiento ME, Leyva J. Genes HLA en una muestra de la población cubana. *Vaccinmonitor*. 2000;(3):3–7.
 15. Caraballo LR, Marrugo GJ, Erlich CH, Mildred Pastorizo L. HLA alleles in the population of Cartagena (Colombia). *Tissue Antigens*. 1992;39(3):128–33.
 16. Bengochea M, Salzano EM. I . Alvarez M . Sans R . Toledo M . Sosa HLA Gene and Haplotype Frequencies in Uruguay. 1993;8:163–4.
 17. Infante E, Olivo A, Alaez C, Williams F, Middleton D, De la Rosa G, et al. Molecular analysis of HLA class I alleles in the Mexican Seri Indians: Implications for their origin. *Tissue Antigens*. 1999;54(1):35–42.
 18. Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, Gorodezky C, et al. Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Hum Immunol*. 2001;62(6):645–50.
 19. D. Middleton, F. Williams, A. Meenagh, A. S. Daar, C. Gorodezky, M. Hammond, E. Nascimento I. Briceno and MPP. Analysis of the Distribution of HLA-A Alleles in Populations from Five Continents. *Management*. 2000;61(00):1048–52.
 20. Alfaro EL, Dipierri JE, Gutiérrez N, Vullo CM. Frecuencias génicas y haplotípicas del sistema HLA en el Noroeste argentino. *Antropo*. 2004;6(June 2014):15–23.
 21. Pédrón B, Yakouben K, Guérin V, Borsali E, Auvrignon A, Landman J, et al. HLA Alleles and Haplotypes in French North African Immigrants. *Hum Immunol*. 2006;67(7):540–50.
 22. Zhang HB, Wei SG, Zheng HB, Yu B, Lai JH. Distribution of human leukocyte antigen alleles and haplotypes in Oroqen and Ewenki nationality minority in Inner Mongolia Autonomous Region of China. *Int J Immunogenet*. 2010;37(5):337–44.

23. Acar M, Cora T, Tunc R, Acar H. HLA-B27 subtypes in Turkish patients with ankylosing spondylitis and healthy controls. *Rheumatol Int.* 2012;32(10):3103–5.
24. Hajeer AH, Al Balwi MA, Ayt??l Uyar F, Alhaidan Y, Alabdulrahman A, Al Abdulkareem I, et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in Saudis using next generation sequencing technique. *Tissue Antigens.* 2013;82(4):252–8.
25. Andric Z, Popadic D, Jovanovic B, Jaglicic I, Bojic S, Simonovic R. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in the Serbian population. *Hum Immunol [Internet].* 2014;75(3):218–26.
26. Kongmaroeng C, Romphruk A, Puapairoj C, Leelayuwat C, Kulski JK, Inoko H, et al. HLA alleles and haplotypes in Burmese (Myanmarese) and Karen in Thailand. *Tissue Antigens.* 2015;86(3):199–204.
27. Sulcebe G, Shyti E. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in a population of 432 healthy unrelated individuals from Albania. *Hum Immunol [Internet].* 2016;77(8):620–1.
28. Esmaeili AR, Zamani Taghizadeh Rabe S, Mahmoudi M, Rastin M. Frequencies of HLA-A, B and DRB1 alleles in a large normal population living in the city of mashhad, northeastern Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2017;20(8):940–3.
29. Loubser S, Paximadis M, Tiemessen CT. Human leukocyte antigen class I (A, B and C) allele and haplotype variation in a South African Mixed ancestry population. *Hum Immunol [Internet].* 2017;78(5–6):399–400.
30. Weiskopf D, Grifoni A, Arlehamn CSL, Angelo M, Leary S, Sidney J, et al. Sequence-based HLA-A, B, C, DP, DQ, and DR typing of 339 adults from Managua, Nicaragua. *Hum Immunol [Internet].* 2018;79(1):1–2.
31. Arnaiz-Villena A, Bayona B, Palacio-Gruber J, Hernández E, Muñoz E, Campos C, et al. HLA genes in Barranquilla (North Colombia): Searching for cryptic Amerindian genes. *Hum Immunol [Internet].* 2018;79(1):3–4.
32. Páez-Gutiérrez IA, Hernández-Mejía DG, Vanegas D, Camacho-Rodríguez B, Perdomo-Arciniegas AM. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies of 1463 umbilical cord blood units typed in high resolution from Bogotá Colombia. *Hum Immunol [Internet].* 2019;6–11.

33. Murphy Kenneth, Travers Paul WM. *Inmunobiología de Janeway*. 2009. 197–205 p.
34. Martínez-Borra J, López-Larrea C. The emergence of the Major Histocompatibility Complex. *Adv Exp Med Biol*. 2012;738:277–89.
35. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004;5(12):889–99.
36. Frank Christiansen BD. The major histocompatibility Complex: A paradigm for studies of the Human Genome. In: *Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice [Internet]*. 2012. p. 133–59.
37. Claas FH, Duquesnoy RJ. The polymorphic alloimmune response in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(5):566–7.
38. Walsh EC, Stevens CR, Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ, Fernando MMA, et al. Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. *PLoS Genet*. 2008;4(4):e1000024.
39. Goddard CA, Butts DA, Shatz CJ. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(16):6828–33.
40. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens*. 2004;64(6):631–49.
41. Beck S, Trowsdale J. the human major histocompatibility complex: Lessons from the DNA Sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;1(1):117–37.
42. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. CR, Morera Barrios LM, García García M de los A. *Revista cubana de hematología inmunología y hemoterapia*. [Internet]. Vol. 23, *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. Centro Nacional de Información de Ciencias Medicas, Ministerio de Salud Publica; 2007 [cited 2018 Oct 29]. 0–0 p.
43. Sung C. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Med J*. 2007;48(1):11–23.
44. Bjorkman PJ, Parham P. structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. 1990;
45. Bjorman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL WD. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987;506:506–512.
46. An J, Lein K, Kie A, Ato S. Review Articles *Advances in Immunology First of Two*

Parts. 2000; Available from: www.nejm.org

47. Engelhard VH. Structure of Peptides Associated with Class I and Class II MHC Molecules. *Annu Rev Immunol.* 2003;12(1):181–207.
48. Sampson C. Peptide Binding for Class I and Class II MHC Molecules. 2015;281–302.
49. Blum J, Wearsch P, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 2013. 443–473 p.
50. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, et al. MHC Molecule HLA-A2 . 1 by Mass Spectrometry. *Science* (80-). 1992;255:1–4.
51. Zimmerman SB. The three-dimensional structure of DNA. *Ann Rev Biochem.* 1982;51:395–427.
52. Watts C. Capture and Processing of Exogenous Antigens for Presentation on Mhc Molecules. *Annu Rev Immunol [Internet].* 1997;15(1):821–50.
53. Wearsch PA, Cresswell P. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(6):624–31.
54. Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 2001;20(10):2357–66.
55. Nguyen TT, Chang S, Evnouchidou I, York IA, Zikos C. NIH Public Access. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(5):604–13.
56. Vigneron N, Ferrari V, Stroobant V, Habib JA, Van Den Eynde BJ. Peptide splicing by the proteasome. *J Biol Chem.* 2017;292(51):21170–9.
57. Yewdell JW. DRiPs Solidify: Progress in Understanding Endogenous MHC Class I Antigen Processing. 2011;32(11):548–58.
58. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell.* 2010;142(4):613–24.
59. Zarling AL, Luckey CJ, Marto JA, White FM, Brame CJ, Evans AM, et al. Tapasin Is a Facilitator, Not an Editor, of Class I MHC Peptide Binding. *J Immunol [Internet].* 2003;171(10):5287–95.
60. Concha-benavente F, Srivastava R, Ferrone S, Robert L, Hospital MG, Program I.

- Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells. 2017;52–8.
61. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*. 2002;419(6906):480–3.
 62. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol*. 2005;6(7):689–97.
 63. Painter CA, Stern LJ. Conformational variation in structures of classical and non-classical MHCII proteins and functional implications. *Immunol Rev*. 2012;250(1):144–57.
 64. Anders AK, Call MJ, Schulze MSED, Fowler KD, Schubert DA, Seth NP, et al. HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nat Immunol* [Internet]. 2011;12(1):54–61.
 65. R. B, C.H. R, S. R, A.W. L, J.J. H, T. B, et al. Achieving stability through editing and chaperoning: Regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol Rev* [Internet]. 2005;207:242–60.
 66. Watts C. The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2012;1824(1):14–21.
 67. Vyas Jatin, Van der Veen Annemarte P hidde. The known unknowns of antigen processing and presentation. 2008;8(8):607–18.
 68. Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*. 1996;84(4):505–7.
 69. Piner valérie, Vergelli Marco, Martin Roland, Oddmund BAkke LE. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA- DR molecules. In 1995. p. 603–6.
 70. Ghosh Partho, Amaya Miguel, Mellins Elizabeth WD. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Natur*. 1995;378:457–62.
 71. Pos W, Sethi DK, Call MJ, Schulze MED, Anders A, Pyrdol J. Crystal Structure of

- the HLA-DM – HLA-DR1 Complex Defines Mechanisms for Rapid Peptide Selection. *Cell* [Internet]. 2012;151(7):1557–68.
72. Castiblanco J, Anaya J-M. Genetics and Vaccines in the Era of Personalized Medicine. *Curr Genomics*. 2015;16(1):47–59.
 73. Maffei A, Harris PE. Peptides bound to major histocompatibility complex molecules. *Peptides*. 1998;19(1):179–98.
 74. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, et al. Supporting Online Material for Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Publ Sci* [Internet]. 2008;322(5904):1097–100.
 75. Heath WR, Carbone FR, Walter T, Hall E, Royal PO. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. 2001;1(November):126–35.
 76. Kumar KS, Duesbery MS, Louat NP, Provenzano V, DiPietro MS. Microporous fine-grained copper: Structure and properties. *Philos Mag A Phys Condens Matter, Struct Defects Mech Prop*. 2001;81(5):1023–40.
 77. Queiro R, Morante I, Cabezas I, Acasuso B. HLA-B27 and psoriatic disease: A modern view of an old relationship. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015;55(2):221–9.
 78. Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, Leo P, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet*. 2015;45(7):730–8.
 79. Asquith M, Elewaut D, Lin P, Rosenbaum JT. The role of the gut and microbes in the pathogenesis of spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2014;28(5):687–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2014.10.018>
 80. Allen RL, O’Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol*. 1999;162(9):5045–8.
 81. Dougados M, Etcheto A, Molto A, Alonso S, Bouvet S, Daurès JP, et al. Clinical presentation of patients suffering from recent onset chronic inflammatory back pain suggestive of spondyloarthritis: The DESIR cohort. *Jt Bone Spine* [Internet]. 2015;82(5):345–51.

82. Velázquez Alejos LP, Martínez Aragón M del C, Cornejo Romero A. Extracción y purificación de ADN. *Herramientas Mol Apl en Ecol.* 2008;1–26.
83. Paredes M, Galindo A, Bernal M, Avila S, Andrade D, Vergara C, et al. Analysis of the CODIS autosomal STR loci in four main Colombian regions. *Forensic Sci Int.* 2003;137(1):67–73.
84. Ossa H, Manrique A, Quintanilla S, Peña A. Polimorfismos del sistema HLA (loci A *, B * y DRB1 *) en población colombiana. *Nova.* 2007;5(7):25–30.
85. Garavito G, Malagón C, Ramírez LA, Cruz OFD La, Uribe O, Navarro E, et al. Polimorfismo de los alelos de los antígenos de leucocitos humanos HLA-DRB1 y su asociación con la artritis reumatoidea juvenil en una muestra de niños mestizos colombianos. *Biomédica* [Internet]. 2003;23(3):254–62. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1219>
86. Moalic-allain V. Pièges de l ' interprétation des anticorps anti-HLA par technologie Luminex TM Pitfalls in interpreting anti-HLA antibodies by Luminex TM technology. 2014;72(2).
87. Tait BD, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid phase HLA antibody detection technology - Challenges in interpretation. *Tissue Antigens.* 2010;76(2):87–95.
88. Morales ER. Departamento administrativo nacional de estadística. Colombia una nación multicultural. 2007;1–49.
89. Arnaiz-Villena A, Juárez I, Palacio-Gruber J, Muñoz E, Campos C, Martínez-Laso J, et al. The first free Africans in America: HLA study in San Basilio de Palenque (Colombia). *Hum Immunol* [Internet]. 2018;79(8):585–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.05.010>
90. Rey D, Moscoso J, Areces C, Parga-Lozano C, Martínez-Laso J, Enriquez de Salamanca M, et al. HLA in Jaidukama: an Amerindian secluded Colombian population with new haplotypes and Asian and Pacific-shared alleles. *Mol Biol Rep.* 2010;38(6):3689–701.
91. Vargas-Alarcon G, Gomez-Prieto P, Silvera C, Parga-Lozano C, Martínez-Laso J, Rey D, et al. HLA genes in Wayu Amerindians from Colombia. *Immunol Invest.* 2010;40(1):92–100.

92. Vargas-alarcón G, Zuñiga GHJ, Rodríguez-pérez JM, Rangel NPC, Martínez-laso CVJ, Arnaiz-villena JGA. Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations. 2003;756–60.
93. Perusco A, Gamba C, Galarza P, Rojas F, Kalapodis A, Onofri A, et al. HLA Antigenic and Haplotype Frequencies Estimated in Hematopoietic Progenitor Cell Donors From Argentina. *Transplant Proc* [Internet]. 2014;46(9):3064–7.
94. Alvarez I, Bengochea M, Toledo R, Carretto E, Hidalgo PC. HLA Class I Antigen and HLA-A , -B , and -C Haplotype Frequencies in Uruguayans. 2006;78(4):513–25.
95. M CEN, S IPH. El desplazamiento forzado en Colombia: La huella del conflicto. 2014;1–6.
96. Gourraud PA, Pappas DJ, Baouz A, Balère ML, Garnier F, Marry E. High-resolution HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 haplotype frequencies from the French Bone Marrow Donor Registry. *Hum Immunol* [Internet]. 2015;76(5):381–4.
97. Arias-Murillo YR, Osorio-Arango K, Bayona B, Ercilla G, Beltrán-Durán M. Determination of HLA -A, -B, -DRB1 polymorphism in brain dead organ donors representative of the Colombian general population, 2007-2014. *Biomédica* [Internet]. 2017;37(2):184–90184.
98. Varade J, Lamas JR, Ferna M, Jover JA, Ferna B, Urcelay E. HLA-B27 and ankylosing spondylitis geographic distribution versus malaria endemic: casual or causal liaison? 2008;67(1):2–5.
99. Mathieu A, Paladini F, Vacca A, Cauli A, Teresa M, Sorrentino R. Autoimmunity Reviews The interplay between the geographic distribution of HLA-B27 alleles and their role in infectious and autoimmune diseases: A unifying hypothesis. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2009;8(5):420–5.
100. Arnaiz-Villena A, Palacio-Grüber J, Juarez I, Hernández E, Muñoz E, Bayona B, et al. HLA in North Colombia Chimila Amerindians. *Hum Immunol* [Internet]. 2018;79(4):189–90.
101. Park H, Lee YJ, Song EY, Park MH. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype frequencies of 10 918 Koreans from bone marrow donor registry in Korea. *Int J Immunogenet*. 2016;43(5):287–96.
102. Akassou A, Yacoubi H, Jamil A, Dakka N, Amzazi S, Sadki K, et al. Prevalence of

HLA-B27 in Moroccan healthy subjects and patients with ankylosing spondylitis and mapping construction of several factors influencing AS diagnosis by using multiple correspondence analysis. *Rheumatol Int.* 2015;35(11):1889–94.

103. Valle-Oñate R, Candia L, Romero-Sánchez C, Iglesias-Gamarra A, Caballero-Urbe C V., Santos-Moreno P, et al. Epidemiology of spondyloarthritis in Colombia. *Am J Med Sci.* 2011;341(4):293–4.
104. Chaplin DD. Overview of immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:41.

9. ANEXOS

9.1 Resultados secuenciación de alta resolución

Resultados de tipificación HLA en alta resolución

Código NMDP									
A1	A2	B1	B2	C1	C2	DRB11	DRB12	DQB11	DQB12
03:AWFBE	29:AWFBH	14:02:01	27:AWFBS	01:AWFCB	08:BCZHV	01:AWFDC	07:11	02:BCZHZ	05:BCZJB

Tipificación Molecular

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1
A*03:01:01G/ A*29:02:01G	B*14:02:01G/ B*27:05:02G	C*01:02:01G/ C*08:02:01G	DRB1*01:01:01G/ DRB1*07:11	DQB1*02:01:01G/ DQB1*05:01:01G

Resultados de tipificación HLA en alta resolución

Código NMDP

A1	A2	B1	B2	C1	C2	DRB11	DRB12	DQB11	DQB12
02:BCZGU	32:BCZGX	27:AWFBS	50:GMD	01:AWFCB	06:AWFCH	04:11:01	04:HTWY	03:AWFCX	03:AWFCX

Tipificación Molecular

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1
A*02:01:01G/ A*32:01:01G	B*27:05:02G/ B*50:01:01G	C*01:02:01G/ C*06:02:01G	DRB1*04:11:01/ DRB1*04:07:01G	DQB1*03:02:01G/ DQB1*03:02:01G

Observaciones: Tipificación en alta resolución realizada por el laboratorio HISTOGENETICS (Numero ASHI 03-1-NY-26-2)

