

# Genes HLA en una muestra de la población cubana

Martha L. Paradoa<sup>1</sup>, Derek Middleton<sup>2</sup>, Armando Acosta<sup>3</sup>, María E. Sarmiento<sup>3</sup>, Jorge Leyva<sup>3</sup>.

1. Hospital Pediátrico "J.M. Márquez". Ciudad de La Habana, Cuba.
2. Northern Ireland Regional Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory, City Hospital. Belfast. North Ireland, UK.
3. Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

Los antígenos codificados por los genes HLA tienen una gran importancia para el trasplante así como constituyen marcadores genéticos para estudios antropológicos y están asociados a diversas enfermedades en cuya etiopatogenia pueden estar involucrados mecanismos inmunológicos. En este estudio se determina la distribución de los alelos HLA en la población cubana de Ciudad de La Habana, como área cosmopolita. Fueron tipados 129 donantes de sangre sanos (70 blancos, 42 mestizos y 17 negros) por la técnica de tipaje de ADN para los alelos HLA –A, B, C y DRB1 mediante PCR y tipaje de oligonucleótidos. El análisis de la frecuencia génica (FG) de cada locus mostró los resultados siguientes: HLA –A \* 0201 (12,3%), \* 0301 (8,07%), \* 2301 (7,8%), \* 2402 (7,8%), \* 0101 (6,7%) y \* 2902 (6,4%); HLA – B \* 35 (9,7%), B \* 44 (9,33%), B \* 07 (8,89%) y B \* 53 (7,6%); HLA – C \* 04 (17,35%), \* 07 (15,5%), \* 0702 (7,20%), \* 0602 (6,77) y \* 0802 (5,9%); HLA – DR \* 02 (14,61%), \* 04 (14,1%), \* 0701 (12,82%), \* 0103 (12,25%), \* 03 (11,9%), \* 11 (11,9%), \* 13 (11,51%) y \* 01 (6,72%). Se encontró una frecuencia elevada en la distribución de un grupo de alelos, lo que podría estar en relación con ciertas combinaciones que confieran ventajas evolutivas contra patógenos, respondiendo a los llamados genes de protección para ciertas enfermedades en nuestra población.

**Palabras claves:** HLA, genes, alelos, población.

## Introducción

En los últimos años el estudio del Genoma Humano y en especial la región HLA ha tenido una explosión. El estudio del Sistema HLA es el elemento central en la compatibilización entre donante y receptor en el trasplante de órganos y tejidos. Los antígenos HLA tienen una gran importancia en la selección y presentación de diferentes péptidos a células T, regulando así la respuesta inmune tanto a antígenos de microorganismos patógenos, como a propios, lo que reviste gran importancia para el desarrollo de vacunas de nueva generación (1-4). Además, ellos son considerados marcadores genéticos para el estudio antropológico y están asociados a diversas enfermedades en cuya etiopatogenia pueden estar involucrados mecanismos inmunológicos (5, 6). La existencia de secuencias aminoacídicas preferenciales comunes a todos los péptidos que se unen a un alotipo MHC y su identificación, permite la producción de péptidos sintéticos inmunogénicos de proteínas de microorganismos patógenos (7). A pesar de la determinación de la secuencia de múltiples genes HLA y de muchas regiones de este complejo queda mucho en el camino de la

caracterización poblacional y el significado que esto tenga desde el punto de vista funcional y práctico (8).

Siendo Cuba un país latinoamericano y caribeño, donde se han mezclado grupos étnicos caucasoides, orientales y negros, entre otros, le corresponde fomentar estudios poblacionales, por las implicaciones que esto tendría para los campos de la antropología, trasplante, genética de las enfermedades y el desarrollo de vacunas, entre otros. Diversos estudios poblacionales, con el uso del tipaje serológico de los antígenos HLA, se han realizado (9, 10, 11), sin embargo, la distribución y caracterización de los genes HLA en nuestra población es totalmente desconocida, por lo que constituyó este el objetivo de nuestro trabajo.

## Materiales y Métodos

Muestra: Se estudiaron 129 donantes de sangre del Banco de Sangre de Marianao, Ciudad Habana, Cuba, escogidos al azar y supuestamente sanos.

Tipaje ADN: La separación de ADN se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica por la técnica de salting-out (12).

Las muestras fueron amplificadas por PCR, analizadas con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSOP) de resolución media y tipadas a nivel de alelo usando sistemas secundarios de SSOP relacionados con amplificaciones específicas de grupo. En dependencia del resultado obtenido en la primera etapa los productos de PCR fueron estudiados por Dot-Blot utilizando sondas con digoxigenina y detección por quimioluminiscencia (13, 14).

Cálculos: La frecuencia génica se calculó por la fórmula ( $fg = 1 - V1 - fa$ ) (15), donde:

fg = frecuencia génica

fa = frecuencia alélica

## Resultados y discusión

Son muchas las evidencias que hacen plantear la idea de que el polimorfismo del sistema MHC es el resultado de la presión evolutiva que genera un determinado patrón de presentación antigénica para la protección frente a las enfermedades infecciosas (16).

Analizando los resultados obtenidos se observa que la población estudiada presenta un gran polimorfismo, tipificándose 38 antígenos del locus A, 35 antígenos del locus B, 24 antígenos del locus C y 14 antígenos del locus DR (Tabla 1).

El polimorfismo HLA y la heterocigocidad, que ocurre con mayor frecuencia que la homocigocidad, brinda al individuo un mejor patrón de respuesta inmunológica frente a los agentes infecciosos. Las variantes raras o nuevas pudieran ser de particular ventaja evolutiva ya que frente a estas los patógenos aún no han logrado evolucionar para evitar la presentación de sus péptidos al sistema inmune por estas variantes HLA.

### Clase 1:

HLA-A: La frecuencia génica de las diferentes familias alélicas muestra que predomina prácticamente una sola variante alélica, estando las otras variantes en muy baja frecuencia o ausentes. En la familia HLA-A\*02 predomina el alelo A\*0201, este alelo se ha demostrado que presenta péptidos de un grupo de importantes patógenos como el Virus Epstein Barr, el Virus de la Hepatitis C y el HIV, entre otros, es probable que su elevada frecuencia

esté en relación con una ventaja evolutiva frente a un grupo de agentes infecciosos. El antígeno HLA-A\*0204 no aparece en nuestra población, el cual está presente en los indios sudamericanos (17). El alelo A\* 0211, aislado de una línea celular de un individuo oriental (18), aparece en nuestra población con una frecuencia muy baja, dado quizás por la influencia oriental existente. En la familia HLA-A\* 24 vemos un comportamiento similar, apareciendo el alelo A\* 2402101 como uno de los antígenos más frecuentes, y el antígeno A\* 2403 con una frecuencia muy baja, no tipificándose el resto de los alelos de la familia. El alelo A\* 2902 es uno de los más frecuentes de la población y de los subtipos del A 29. Sólo se detectaron los antígenos A\*0301 y A\*1101, no apareciendo los otros alelos de estas familias. Es conocido que el antígeno HLA-A\*68 es relativamente inefectivo en proveer protección inmunitaria pues no se une a células CD8 (19); los resultados nos muestran que en general este alelo tiene muy baja frecuencia, lo que significa que ha habido una buena selección contra los "malos alelos" en nuestra población.

HLA-B: Dentro de las variantes alélicas del antígeno B\* 27, sólo tipifican el B\*27 y el B\* 2702 a pesar de ser una de las familias más polimórficas que existe. El alelo B\*1503 aparece con una frecuencia muy baja comparado con la otra variante. Sólo aparece una variante del B\* 7, aunque un individuo ofreció un patrón de reacción atípico que después de ser estudiado a profundidad dio lugar a la descripción de un nuevo alelo, HLA-B\* 0720, el cual fue reconocido por el Comité de Nomenclatura de la OMS (20). Este locus es el de menor frecuencia de blanco (individuos con un solo alelo identificado), lo que indica una detección casi total de sus alelos.

El alelo B\* 53 se encuentra con una frecuencia elevada. Este alelo se asocia con protección a desarrollar cuadros severos de Malaria (21) y su presencia en nuestra población pudo desempeñar algún papel disminuyendo la frecuencia de formas graves de la enfermedad en la época que la misma era endémica en nuestro país.

HLA-C: Los antígenos Cw4 y Cw7 son los más frecuentes al igual que en otros grupos poblacionales latinoamericanos (22), comportándose como un "marcador" de esta área.

La información obtenida relacionada con la frecuencia de los alelos de la Clase 1 resulta de gran importancia para el diseño de vacunas peptídicas adaptadas a nuestra población ya que pudiera permitir la selección de péptidos con una alta probabilidad de ser presentados adecuadamente después de la vacunación.

**Tabla 1. Frecuencia génica de la población estudiada**

LOCUS – A		LOCUS – B		LOCUS – C		LOCUS – DR	
Alelo	fg	Alelo	fg	Alelo	fg	Alelo	fg
0101*	6,7*	07*	8,89*	01	1,15	01*	6,72*
0201*	12,3*	08	2,32	0202*	5,55*	0103	1,22
0202	0,4	0801	2,32	03	3,1	02*	14,61*
0205	1,15	13	1,56	0302	0,4	03*	11,9*
0207	0,4	14*	5,9*	0303	1,91	04*	14,1*
0211	0,4	15	4,0	0304	0,8	11*	11,9*
0217	0,4	1503	0,4	04*	17,35*	12	1,56
02	3,1	18	4,3	0501	4,3	13*	11,51*
0301*	8,07*	22	0,4	0602*	6,77*	1303	2,32
1101	2,73	27	1,15	07*	15,5*	14	2,73
2301*	7,6*	2702	0,4	0702*	7,20*	0701*	12,82*
24	0,8	35*	9,77*	0704	0,8	08	4,0
2402101*	7,6*	3701	1,15	0802*	5,9*	0901	1,91
2403	0,8	3801	2,73	12	0,4	1001	2,32
2501	0,4	39	1,91	1202	0,8	BL	5,13
2601	3,1	40	0,8	1203	4,3		
2901	0,8	4001	2,73	1204	1,56		
2902*	6,4*	41	0,4	14	0,8		
3001	1,91	4102	1,56	15	3,51		
3002	4,76	4201	4,0	1501	0,4		
3004	0,4	44*	9,33*	1505	1,56		
31012	1,56	4402	0,4	1601*	5,13*		
32	0,4	4501	2,32	17*	5,9*		
3201	2,32	4601	0,4	18	1,56		
33	0,4	4701	1,15	BI	7,20		
3301	3,1	4802	1,15				
3303	1,91	4901	4,3				
3402	1,56	5001	2,32				
3601	1,15	51	4,76				
6601	1,91	52	0,8				
6602	0,8	53*	7,6*				
68	0,4	57	2,73				
6802	4,0	5801	3,51				
6803	0,8	5802	1,91				
68011	2,32	78	1,56				
68012	1,15	BI	1,15				
6901	0,4						
74	3,1						
BI	4,76						

\* : Antígenos más frecuentes (> 5%)

fg: frecuencia génica

BI: blanco

## Clase 2:

HLA-DR: Prevalcieron los alelos DR\* 02,04,07,03,11, 13 y 01. Los resultados obtenidos en este estudio pudieran reflejar aproximadamente la distribución de los diferentes alelos en nuestra población ya que la muestra fue obtenida en una ciudad cosmopolita, aunque no se pueden descartar las discrepancias de las frecuencias encontradas dependiendo de las regiones geográficas entre otros factores.

Diversos criterios se discuten hoy en día acerca de la selección de los alelos MHC y especialmente del sitio de presentación antigénica (PBR), sobre todo después de conocer la estructura tridimensional de las moléculas Clase 1 y la presunta estructura terciaria de las moléculas de Clase 2 (23,24). A pesar de que la deriva genética desempeña un importante rol en determinar la frecuencia de los distintos alelos de una población, parece que otros factores también son importantes, tales como migraciones, mezclas poblacionales y cambios climáticos y ambientales que determinan una particular función del sistema inmune (25). Los

resultados de este estudio evidencian un marcado polimorfismo del Sistema HLA en nuestra población. Cada familia de antígenos está representada por una o dos variantes alélicas de elevada frecuencia con respecto a las otras. Otro elemento interesante lo constituye la presencia con frecuencias elevadas de alelos que confieren ventaja evolutiva frente a distintos agentes infecciosos (A\* 0201, B\* 53) y la escasa frecuencia de alelos con baja eficacia en la presentación de antígenos microbianos (A\*68).

La caracterización poblacional nos permite adentrarnos no solamente en el estudio de las causas, sino además en el de los mecanismos de selección, sobredominancia y/o selección dependiente de la frecuencia (26, 27).

Los resultados obtenidos contribuyen a profundizar en el conocimiento de la distribución de los alelos HLA en nuestra población y complementan estudios poblacionales serológicos previos, lo que brinda información importante para estudios relacionados con el trasplante, antropológicos, de asociación con enfermedades y para el desarrollo de nuevas vacunas.

## Referencias

1. Germain RH and Margulias DM. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation *Annual Review of Immunology*. 1993; 11:403-450.
2. Unanue ER. Cellular studies on antigen presentation by class 2 molecules. *Current Opinion in Immunology*. 1992; 4:63-69.
3. York IA and Rock KL. Antigen processing and presentation by class 1 major histocompatibility complex. *Annual Review of Immunology*. 1996; 14:339-396.
4. Zinkernagel RM and Doherty PC. MHC- restricted cytotoxic T cell studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigen determining T cell restriction: Specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* 1979; 27:52.
5. Tiwari J and Terasaki PI. *HLA and disease associations*. New York: Sproger- Verlag; 1985.
6. Degos L. Repartition antropologique des genes HLA et dynamique des populations. In: Dausset J, Pla M., eds. HLA complexe majeur d' histocompatibilite de l' homme. Paris. *Flammarion Medicine Sciences* ;1989:215-232.
7. Chicz RM and Urtan RG. Analysis of MHC presented peptides: Application in autoimmunity and vaccine development. *Immunology Today*. 1994; 15(4):155-160.
8. Trowsdale J, Raugossis J and Cambell RD. Map of the human MHC. *Immunology Today*. 1991; 12:443-446.
9. Arce S. Analisis mediante el empleo de la computación electrónica de los resultados del Workshop Internacional de Histocompatibilidad en Cuba. *Sangre*.1976; 21(2): 217-223.
10. Toledo I y Paradoa ML. Estudio de los antígenos de clase 2 (HLA-DR) en Cuba [tesis de especialista]. La Habana: ICBP "Victoria de Girón". ISCM; 1988.
11. Diaz JW, Cheredeev AN. Distribution f HLA antigens in a Cuban population. *Tissue Antigens*. 1977; 9:71-79.
12. Miller SA, Dykes DD, Poleskey HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Rev*. 1988; 16:215
13. Williams F, Mallon E, Middleton D. Development of PCR-SSOP for HLA-A typing of bone marrow registry donors. *Tissue Antigens*. 1997; 49:61-66.

14. Williams F, Meenagh A, Maxwell AP, Middleton D. Allele resolution of HLA- A using oligonucleotide probes in two – stages. *Tissue Antigens*. 1999; 54:59-68.
15. Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF. Human Evolution. In: *The Genetics of Human Populations*. San Francisco. W.H. Freeman. 1971; 683-752.
16. Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules: *Science*. 1996; 272:67.
17. Castaño AR y López de Castro JA. Structure of the HLA- A\* 0204 antigen, found in South American Indians. Spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism. *Immunogenetics*. 1991; 34:281- 285.
18. Castaño AR y López de Castro JA. Structure of the HLA-A2.5 subtype: further evidence for selection-driven diversification of the HLA-A2 antigens. *Immunogenetics*. 1992; 35:345-347.
19. Parham P. Evolution of class 1 HLA polymorphism, selection, and drift. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasasuki T, (eds). *HLA 1991: Proceedings of Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Held in Yokohama, Japan, November 6-13, 1991*. Oxford University Press: 1992; 538-547.
20. Williams F, Curran MD, Paradoa Perez M, Acosta A, Middleton D. Characterisation of a new HLA-B allele, HLA-B\*0720, identified in the Cuban population. *Tissue Antigens*. "En Prensa".
21. Hill AUS. HLA associations with Malaria in Africa. In Klein J and Klein D., eds. *Molecular Biology of the MHC* Heidelberg: Springer-Verlag; 1991:403.
22. Gorodezky C, Loon J, Mlierno R, Torres E, Gerbase de Lima M, Pelegrino J. HLA in some Latin American populations: Mexicans, Brazilians, Venezuelans and Uruguayans. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasasuki T. (eds). *HLA 1991: Proceedings of Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Held in Yokohama, Japan, November 6-13, 1991*. Oxford University press: 1992; 538-547.
23. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, and Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class 1 histocompatibility antigens. *Nature*. 1987; 329:512.
24. Brown JH, Jerdetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, and Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class 2 histocompatibility molecules. *Nature*. 1988; 332:845.
25. Klein J, Satta Y. and O' h Uigin C. The molecular descent of the Major Histocompatibility Complex. *Annu. Rev Immunol*. 1993; 11:269-295.
26. Hughes AL, Nei, M. Pattern of nucleotide substitution at Mayor Histocompatibility Complex class 1 loci reveals overdominant selection. *Nature*. 1988; 335:167.
27. Hughes AL, Nei M. Nucleotide substitution at Mayor Histocompatibility Complex class 2 loci:evidence for overdominant selection. *Proc Natl Acad. Sci. USA*.1989; 86:958.

## HLA genes in a sample of the Cuban population

### Abstract

The antigens coded by the HLA genes have a great importance in transplantation, and as genetic markers for anthropological studies, and they are associated to diverse illnesses, in whose pathogenic immunology mechanisms they could be involved. In this study, the distribution of HLA alleles was determined in the Cuban population of Havana City, as a cosmopolitan area 129 healthy blood donors were studied (70 whites, 42 mixed blood (black x white) and 17 blacks), by DNA typing for HLA–A, B, C and DRB1 alleles using PCR and oligonucleotide typing. The gene frequency analysis (GF) of each locus showed the following results: HLA–A \* 0201 (23,2%), \* 0301 (15,5%), \* 2301 (14,7%), \* 2402 (14,7%), \* 0101 (13,1%) and \* 2902 (12,4%); HLA–B \* 35 (18,6%), \* 44 (17,8%), \* 07 (17%) and \* 53 (14,7%); HLA–C \* 04 (31,7%), \* 07 (28,6%), \* 0702 (13,9%), \* 0602 (13.1) and \* 0802 (11,6%); HLA–DR \* 02 (27,1%), \* 04 (26,3%), \* 03 (22,4%), \* 11 (22,4%), \* 13 (21,7%) and \* 01 (13,9%). A high frequency in the distribution of a group of alleles was found. This fact could be related to combinations that give evolutionary advantages against pathogens in our population.

**Key words:** HLA, genes, allele, and population.