

Bloques de ADN en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); mapas genéticos en poblaciones y en enfermedad

DNA blocks in the major histocompatibility complex (MHC); genetic map in population and disease

EDMOND J. YUNIS, LILIANA ENCINALES, OLGA CLAVIJO,
 JOSÉ AZOCAR, JOSEPH SUÁREZ, TATIANA ROMERO, VIVIANA ROMERO,
 INGRID ALMÉCIGA · BOSTON, MASSACHUSETTS, E.E.U.U.
 CARLOS AWAD, CARLOS TORRES, EMILIO YUNIS · BOGOTÁ, D.C., COLOMBIA

Inmunogenética actual

La genética de la respuesta inmune comenzó con el descubrimiento del complejo mayor de histocompatibilidad en 1947 con estudios en el ratón y el descubrimiento del CMH llamado H-2. Este sistema está compuesto de varios genes que tienen funciones que controlan la respuesta inmune, anticuerpos y productos celulares mediados por linfocitos T, células con el marcador CD4 y CD8. Las células CD4 proliferan en presencia de los antígenos de la Clase II al igual que las células CD8 reconocen productos genéticos de los loci de la Clase I; en las dos situaciones la unión de estas dos moléculas reconoce péptidos (propios o foráneos) específicos. Es importante reconocer que todos estos genes funcionales son polimórficos (variables) debido a diferencias de aminoácidos, y que este polimorfismo produce incompatibilidad cuando se trasplantan tejidos de un donante que difiere con el huésped. Durante los últimos 45 años la definición del polimorfismo del CMH se desarrolló para obtener mejor aceptación de injertos de órganos y de trasplantes de médula ósea. Las variantes son específicas de acuerdo con las etnias o para definir el origen genético de las poblaciones o nacionalidades, por lo que se ha usado para estudiar mezclas étnicas, en estudios de mestizaje o de poblaciones que resultan de mezclas de grupos ancestrales.

El desarrollo de la genética se incrementó en los últimos veinte años con el estudio de cambios de nucleótidos en el genoma humano, lo que ayudó al conocimiento de su secuencia. Es importante reconocer que en los humanos los nucleótidos forman entre 30 y 35.000 genes, pero que el número de proteínas es aproximadamente cuatro veces mayor. Los genes pueden ser estudiados con cantidades mi-

núsculas de tejido por medio de microchips o en procedimientos que en forma genérica se llaman microarrays. También es posible estudiar múltiples proteínas en tejidos o en células (proteomics). En el caso de estudios del ADN mediante microchips, éstos se pueden usar tanto para el estudio de genes como para analizar variantes o polimorfismos.

El conocimiento de las secuencias del gen permite estudiar polimorfismos, pero con el uso de los anticuerpos monoclonales, para descubrir la expresión de genes, los resultados obtenidos reflejan la síntesis de proteínas producidas o por un gen o por interacciones genéticas. En este artículo presentamos una actualización sobre los loci más estudiados del CMH. Como se resume en los párrafos siguientes, existen diferencias en el tamaño de porciones de la secuencia de ADN que varían de individuo a individuo y que son diferentes en composición genética en diferentes etnias. Los bloques se mantienen como unidades genéticas que se fijaron históricamente en una población dada y que implican que existen variantes en genes y loci en los cuales las recombinaciones ocurren con poca frecuencia. En el cromosoma 6 el tamaño del bloque grande es de unos 3.5 megabases (millones de bases o nucleótidos). La descripción de bloques ocurrió desde el comienzo de los estudios del CMH cuando se observó que los bloques están formados por variantes de loci vecinos

Drs. Edmond J. Yunis, Liliana Encinales, Olga Clavijo, José Azocar, Joseph Suárez, Tatiana Romero, Viviana Romero, Ingrid Alméciga: Dana Farber-Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, E.E.U.U.; Dr. Carlos Awad: Hospital Santa Clara, Bogotá, Colombia; Dr. Carlos Torres: Fundación Neumológica, Bogotá, Colombia; Dr. Emilio Yunis: Servicios Médicos Yunis-Turbay, Bogotá, Colombia.

Bloques genéticos del CMH

La herencia del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) ha sido estudiada extensamente. En esta presentación se hace hincapié en el hecho de que por estudios familiares es posible identificar la herencia de la región de 3.2 megabases de ADN, o más de 3 unidades genéticas llamadas centimorgans. Cada centimorgan permite una recombinación en 100 meiosis. Originalmente el mapeo se basó en observaciones de recombinaciones en familias. El orden de posiciones HLA-A, B, DR (Clase I y Clase II) fue descubierto en 1971 por Edmond J Yunis y D. B. Amos (el último murió el pasado mes de abril, y este artículo está dedicado a él). Un aspecto muy estudiado es el fenómeno del desequilibrio de los ligamientos genéticos (Linkage disequilibrium) fenómeno que ocurre en muchas regiones del genoma ya que existen alelos de loci cercanos que se encuentran asociados, no al azar, y forman bloques o fragmentos cromosómicos de tamaños variables de individuo a individuo. Durante más de 20 años en el laboratorio del Dr. Edmond J Yunis, Dr. CA Alper, Dr. . Awdeh con varios colaboradores se estudiaron estos bloques y fueron usados como unidades genéticas que sirven para el estudio de diversidad genética. Esto ha sido utilizado para el mapeo de genes de susceptibilidad a enfermedades autoinmunes y para estudios de la respuesta inmunitaria. Este modelo se está utilizando para mapear genes que sirven para definir riesgos de enfermedades infecciosas como hepatitis C, tuberculosis en Colombia y enfermedades autoinmunes.

Fijación de alelos de los haplotipos extendidos conservados

Los haplotipos más conservados incluyen HLA-Cw/B, TNF, HSP-70, complotipos y HLA-DR/DQ. La Tabla 1 ilustra los más frecuentes en caucásicos. Nótese que los complotipos (C2, BF, C4A y C4B)-CyP21 (80-120kb) son marcadores de HECs que son informativos en combinación con los bloques HLA-Cw, Bw y HLA-DR, DQ. Los microsatélites de TNF y las variantes de la región promotora también se heredan como unidades genéticas.

Medida de la frecuencia agregada de bloques (FAB)

La Tabla 2 ilustra estimados de la FAB pequeños o mayores para ilustrar qué individuos de descendencia africana o asiática tienen mayor diversidad genética que los caucásicos.

Tabla 2. Frecuencia agregada de bloques y bloques grandes.

Grupo etnias	A*,Cw*	Cw*,B	DRB1*,DQB1*	Cw*,B* DRB1*,DQB1*	A*,Cw* Cw*,B DRB1*,DQB1*
Americanos caucásicos	0,25	0,77	0,53	0,35	0,15
Americanos africanos	0,20	0,60	0,48	0,11	0,03
Americanos asiáticos	0,21	0,66	0,54	0,09	0,08

Algunos ejemplos del uso de estudios de familias para mapear genes con susceptibilidad dentro del CMH se muestran en la Tabla 3 (dos ejemplos de dos defectos genéticos presentes en HEC (No. 1 y 2), dos ejemplos en enfermedades autoinmunes (No. 3 y 4) y un ejemplo de un HEC de población específica (No. 5).

Hemos desarrollado un modelo para describir los tamaños variables de fragmentos o bloques del ADN conservados en el CMH basado en frecuencias conocidas de cuatro bloques (<.02 MB de ADN): HLA-Cw, B; TNF; complotipo y HLA-DR, DQ. Cada uno de ellos está compuesto de 2, 3 o más alelos de loci asociados genéticamente (Linkage) que se heredan como unidades genéticas. Los bloques pequeños o más grandes (haplotipos extendidos conservados: HEC) se pueden hallar en individuos no relacionados. Esta información puede usarse en registros de donantes para trasplantes. Cuando no se tiene la información de haplotipos derivados de estudios de familia, se puede deducir con base en información de frecuencias conocidas de haplotipos comunes cuya determinación se basa en estudios de información y estimación (desequilibrio de enlace DE). Por ejemplo, las frecuencias de un locus A y si están asociados deben ser al azar $f(AB) = f(A) \times f(B)$. Si esto no ocurre, la medida de es igual: $D = f(AB) - f(A) \times f(B)$; si la medida es alta, indica desequilibrio genético. Las frecuencias de los haplotipos HLA-A, Cw, y HLA-DRB1, DQB1 se usan para obtener la frecuencia de haplotipos comunes. El 85% de haplotipos comunes son HEC. Éstos requieren tipificación en familias que incluyan en el estudio los complotipos y el TNF.

Algunos alelos que son parte de los bloques (Clase I y Clase II) son reconocidos por las células del sistema inmunitario; por esto se da un esquema general de esta relación.

Respuesta inmune

En la Figura 2 se resume en forma muy general que existen dos clases de defensa en animales y hombres: 1)

Tabla 3. Haplotipos extendidos en enfermedad y etnicidad.

	CW*	B*	Microsatélites TNF				Complotipo	DRB1	DQB1
			a	b	d	e			
1	1203	1801	10	4	3	3	S042	1501	0602
2	06	47					FC91,0	0701	02
3	0304	1501	2	1	2	3	SB42	0401	0302

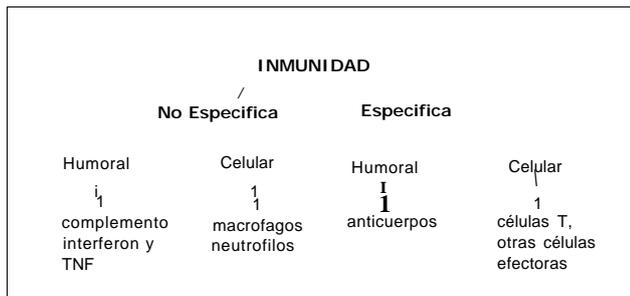


Figura 2. Respuesta inmune

innata, natural o no específica, y 2) específica, con memoria de reconocimiento antigénico.

En esta última se involucran las moléculas de la Clase I y Clase II puesto que su función es la presentación antigénica (péptidos) que tienen especificidad o tienen restricción inmunitaria.

La figura 3 ilustra la base funcional de los productos de genes de la Clase I y de la Clase II y la importancia del reconocimiento de péptidos por receptores de células CD4 y CD8.

La figura muestra el heterodímero Clase II (lado izq.) y Clase I (lado der.) Noten que la molécula de HLA está compuesta por dos cadenas (proteínas) con una porción intracelular en la Clase I y dos en la Clase II. El bolsillo funcional de la Clase II se forma por ambas proteínas (HLA-DR) o sólo por la cadena pesada Clase I. La figura también muestra en rojo la parte funcional, la cadena b2 en la Clase II, y la al y a2 en la Clase I; los puntos rojos sirven de ejemplos de variabilidad de aminoácidos en el bolsillo de la parte funcional de las moléculas (10).

En general este sistema incluye células que reaccionan con antígenos foráneos o no propios, pero si algunas de las células que reaccionan con péptidos propios no se eliminan durante el período embrionario (*selección positiva y negativa**), el individuo nace con la potencialidad de producir reacciones contra sus propios antígenos, lo que lleva a la autoinmunidad. Aquí solamente tomamos en cuenta el estudio del CMH como marcador de la población y marcador de respuesta inmunología y asociación con progreso de infección en la tuberculosis o en la persistencia de la viremia en el caso de la hepatitis C.

• **Selección positiva y negativa.** La selección positiva y negativa ocurre en el timo durante el desarrollo embrionario. La selección positiva elimina las células que no tienen afinidad por antígenos propios; quedan las células que son útiles para reconocer antígenos del exterior y también las que potencialmente pueden causar autoinmunidad antígeno-específico. La selección negativa elimina por delección clonal células con receptores que tienen gran afinidad antigénica de lo propio (self) o también se pueden inactivar. Sólo queda el repertorio de células cuyos receptores se pegan a moléculas del CMH (propias); las células T, en suma, tienen restricción del CMH, y son tolerantes a sus antígenos.

Mapeo de la susceptibilidad de genes de enfermedades autoinmunes

Los haplotipos extendidos conservados o sus fragmentos pueden servir de marcadores para enfermedades, respuestas inmunes o diversidad genética. Alelos de susceptibilidad o de protección pueden encontrarse en HEC o en varios de sus fragmentos o bloques pequeños. Los primeros

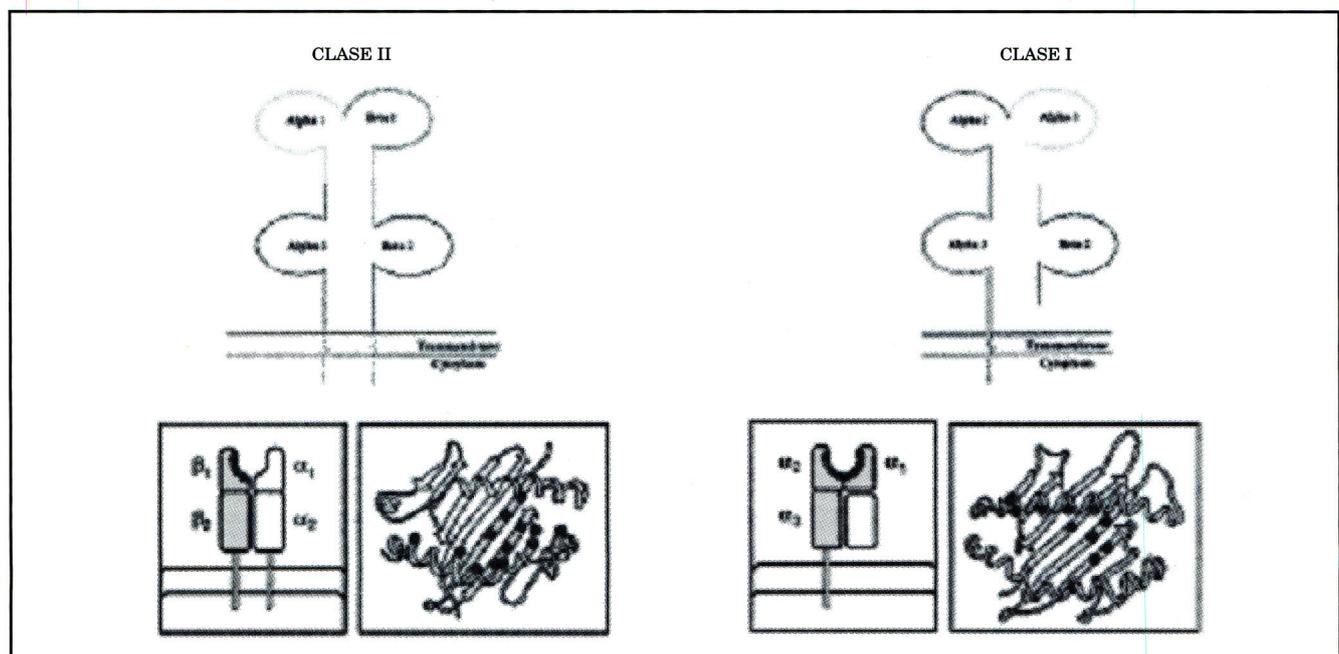


Figura 3. Base funcional de los productos de genes de la clase I y clase II

ejemplos del uso de estudios de familia para identificar HECs asociados con susceptibilidad a enfermedades incluyen estudios de la diabetes del tipo 1 y deficiencia IgA. El mapeo genético de un locus susceptible a enfermedad se puede hacer cuando un número significativo de pacientes posee el alelo específico en fragmentos de haplotipos. Ejemplos de tales estudios son la dermatitis herpetiforme (DH) y la enteropatía gluten-sensitiva (EGS), que comparten aspectos clínicos y marcadores de HECs. Dos HECs ([HLA-B8, SC01, DR3] y [HLA-B44, FC31, DR7]) son altamente frecuentes en ambos grupos de pacientes. El análisis del HEC de pacientes con sólo fragmentos de estos haplotipos demostraron que el HLA-DR3, -DQ2, y el -DR7, DQ2, son los más comunes en EGS, pero el complotipo SC01 fue el bloque marcador más común para el DH. Estos estudios sugirieron que el gen en el CMH susceptible a DH está localizado entre la Clase II y el complotipo, mientras que para el EGS está dentro, o por lo menos más cerca de la región Clase II. Los bloques DR/DQ para estos dos HECs han sido determinados ahora como (DRB1*0701, DQB1*0202) y (DRB1*0301, DQB1*0201). En forma similar se ha mapeado el alelo susceptible para el pénfigo vulgar en pacientes de origen no judío en la Clase II (HLA-DRB1*1401, DBQ1*0503) y no en la región del complotipo (SB45) del HEC [HLA-Cw*0303, B*5502, SB45, DRB1*1401, DBQ1*0503], porque la enfermedad está asociada con ambos, el HEC y sus fragmentos, sin el complotipo, y el bloque HLA-Cw, [se puede deducir el alelo de los bloques Clase I y Clase II de las frecuencias conocidas]. En pacientes judíos es más difícil porque el mapeo en el haplotipo HLA-26, SC21, DRB1*0302, DBQ1*0302, DBQ1*0301 porque es menos frecuente encontrar bloques pequeños en la población. Aún más, es difícil conocer una molécula que sea común en los dos grupos étnicos y que esté involucrada en la patogenia de la misma enfermedad. Por ejemplo, una molécula común en los judíos y no judíos que presente péptidos de las proteínas caderinas de la piel que en individuos susceptibles producen autoanticuerpos y ampollas en la piel.

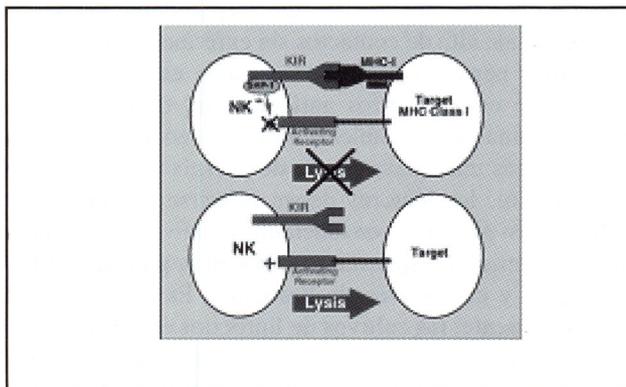


Figura 4. Inhibición de la lisis de una célula blanca reaccionando con el KIR (17).

Mapeo genético de enfermedades infecciosas

El estudio de bloques genéticos es importante porque es más económico comenzar con una región cromosómica que estudiar desde un comienzo 30.000 genes del genoma humano. No discutiremos todos los genes o proteínas (citocinas y quemocinas) que se producen como resultado de activación de células de la respuesta inmune. Aunque la inmunidad no específica es compleja, sólo mencionaremos que entre las células del sistema inmune existen las células asesinas naturales (NK) que son importantes en la eliminación de células tumorales, o de células infectadas con virus o con bacterias. Es interesante que las moléculas del CMH (Clase I) que tienen como papel fundamental activar células CD8 o citotóxicas se basan en mecanismos de activación que requieren activación de células CD4 ayudadoras. Estas moléculas (Clase I) tienen un papel importante en la inhibición de citotoxicidad por las células NK. Estas proveen receptores que se ligan a los alelos o grupos de alelos de genes del CMH de la Clase I. Son importantes porque pueden reconocer lo propio, pero en circunstancias especiales o bloquean la inhibición (KIR) o se activan (KAR) para la matanza de blancos (infectados o tumorales). (Figura 4).

Todo esto nos conduce a estudiar bloques grandes para buscar bloques pequeños que contienen alelos loci con asociación (susceptibilidad) o con resistencia para enfermedades. En todo caso, es útil definir bien todos los polimorfismos dentro del CMH.

Ilustraremos este concepto en dos enfermedades: 1) la hepatitis C de pacientes hispanos de Massachusetts y 2) tuberculosis de Colombia del Hospital Santa Clara y del Instituto Neumológico de Bogotá.

Hepatitis C

Un caso no resuelto es encontrar patrones genéticos de inmunidad no específica o inmunidad específica para el control de la viremia producida por la infección del virus de la Hhepatitis C. Es un caso especial puesto que el alelo

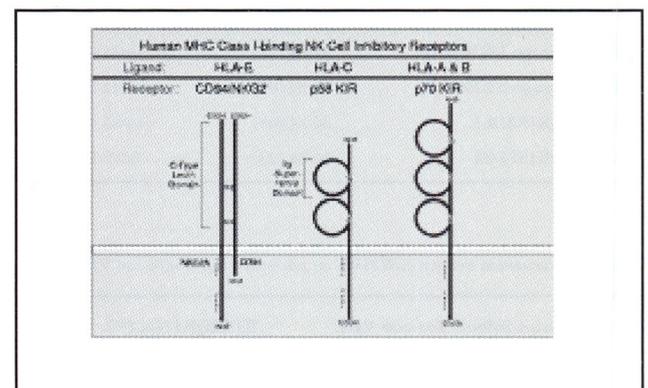


Figura 5. En esta figura se ilustran algunos ejemplos de los receptores de las células NK con los ligantes HLA.

HLA-DQB1*0501 es un factor de riesgo para el desarrollo de la viremia en caucásicos y se halló contrariamente asociado con resistencia viral. Una posible explicación es que existan otros genes del CMH en asociación no al azar con el alelo DQB1*0501 que sean importantes en la patogenia de los efectos colaterales de la infección del VHC.

XI - DQB1*0501 Caucásicos
 Y1 - DQB1*0501 Hispanos

Esto se ilustra en la figura 5, donde X y Y son alelos diferentes asociados al DBQ1*0501 en diferentes etnias y con efectos colaterales opuestos. Se estudian dos posibilidades: 1) alelos de Clase I que involucrarían a los receptores de las células NK y 2) alelos DQA1 que producen heterodímeros con HLA-DQB1*0501. Se estudian alelos de la Clase I: HLA-A, Cw y porque son ligantes de los receptores KIR. La hipótesis estudiada se basó en la posibilidad de que el HLA-Cw*04 esté asociado con persistencia del virus (19). Además, este alelo es el ligante molecular al receptor KIR2DL1 de las células NK.

La Tabla 4 demuestra que no hay diferencia en las frecuencias de la persistencia o eliminación de la viremia. De interés es encontrar una tendencia positiva en el grupo Cw1/KIR2DS2 con la eliminación del virus. Esto necesita ser estudiado en un número mayor de pacientes. Las frecuencias de los alelos de la Clase I no demuestran diferencias, sugiriendo que el gen responsable está en la región de la Clase II (ejemplo DQ). Un dato que no se esperaba es que el receptor KIR2DS4 cuyo ligante es desconocido se halla asociado con persistencia del virus (Tabla 5)

Además, el alelo DQB1*0501 de nuestro ejemplo puede estar asociado con DRB1*1502, DQA1*0101 en caucásicos, con DRB1*1001, DQA1*0104 en africanos y con DRB1*1301 y 1302 en africanos y con DRB*1502, DQA1*0102 en hispanos. Nuestro estudio demuestra que el DQA1*0102 está asociado con eliminación del virus y que el DQA1*0101 y DQA1*0104 con viremia persistente,

Tabla 4. Frecuencias de las combinaciones HLA/KIR en individuos infectados con VHC.

Frecuencias del fenotipo	Persistencia del VHC No. (%)	Eliminación del VHC No. (%)
HLA-Cw grupo 1/KIR2DS2	24/84 (29)	19/41 (46)
HLA-Cw grupo 2/KIR2DL1	57/84 (68)	23/41 (56)
HLA-Bw4/KIR3DL1	30/44 (68)	14/25 (56)
HLA-Bw4/KIR3DS1	10/44 (23)	5/25 (20)

Tabla 5. Frecuencia del gen KIR2DS4 en pacientes infectados con VHC.

Pacientes infectados con VHC	KIR2DS4 No. (%)
Persistencia	44/94 (48)
Eliminación	12/46 (26)
	p: 0.02

concluyendo que el mapeamiento excluye la región de genes de la Clase I, y en la Clase II es importante excluir el locus HLA -DR. Como mejor definición, el gen responsable resulta del heterodímero DQB1 y DQA1.

En resumen, la región Clase II está asociada con la viremia en infección del VHC. Pero es necesario estudiar las moléculas DQ, no solamente el DQB1 sino también el DQA1 para identificar alelos que influyen en el progreso de la viremia.

Tuberculosis

Hemos iniciado un estudio de la tuberculosis pulmonar en Bogotá. El grupo de control reclutado se basó en contactos de los pacientes, sus familiares, amigos y aquellos empleados del hospital (se intentó reclutar solamente mestizos del mismo grupo socioeconómico con abuelos de origen colombiano y de la vecindad de Bogotá; en ningún caso hubo abuelos de origen europeo, asiático o africano). El 70% de los controles dieron una respuesta negativa al examen de PPD investigado en la dermis del antebrazo. Una comparación de la tipificación del alelo HLA-DQB1 de control con reacción PPD negativo o positivo (careciendo de progreso de infección mediante rayos-X o baciloscopia) demostró frecuencias comparables. Los pacientes con tuberculosis activa tuvieron una frecuencia de HLA-DQB1*0501 de 17/54 (.31) que fue diferente a la de los controles PPD - 13/79 (.16) p: .02 OR 2.1 o con todos los controles que incluyen los PPD + 15/99 (.15) p: .02 OR 2.4. De manera interesante, el alelo HLA-DQB1*0501 es el que se halló en los pacientes hispanos con VHC (virus de la hepatitis C) con viremia persistente. Este estudio deberá ser confirmado en un nuevo grupo de pacientes y controles. Además, como en el caso de la hepatitis C, es necesario estudiar los alelos DQA1 puesto que encontramos el alelo DQA1*0102 que es parte del heterodímero DQB1*0501, DQB1*0102, está asociado con el control de viremia VHC.

Aunque la prueba de reacción de la hipersensibilidad retardada (PPD) de la piel debe ser confirmada usando cultivos celulares y mediciones de citokinas interferon gama e interleukinas 4 y 10, fue sorprendente encontrar un porcentaje alto de contactos sin enfermedad activa con resultados negativos usando la prueba en la piel. Será importante estudiar otros antígenos del tipo Cándida y estreptolisina para establecer si existe en los contactos colombianos una nueva forma de anergia específica. En este aspecto, los lectores deben referirse a reportes de hallazgos en pacientes con tuberculosis activa en Cambodia que demostraron respuesta negativa en la prueba de PPD en la piel y en cultivos de linfocitos. Es interesante el hecho siguiente: los cultivos de linfocitos en presencia de tuberculina fueron negativos y los sobrenadantes de ellos demostraron cantidades altas de interleukina 10, lo que sugiere que la anergia producida fue específica porque los cultivos con virus de sarampión y antígeno de *Candida*

albicans fueron normales. Los datos sugieren que esta forma de anergia es mediada por células TH2 que contrastan con la producción normal de citocinas de células de las células TH1 presentes en individuos que reaccionan normalmente con PPD. Por lo tanto, será importante estudiar la respuesta de las células TH1 y TH2 en los controles con contacto permanente con pacientes en Colombia y comparar los resultados con pacientes con enfermedad activa y contactos que producen respuesta positiva. Así mismo, es importante estudiar la posibilidad de que macrófagos o células dendríticas infectadas en el laboratorio en los contactos PPD- eliminan el mycobacterium y que los contactos PPD+ o los pacientes con enfermedad permiten su cultivo. Estos estudios indicarían que la forma de anergia de individuos PPD- con contacto repetido con pacientes, en Colombia, poseen una inmunidad no específica contra la tuberculosis, tal vez producida por selección natural durante el proceso de mestizaje en Colombia.

Resumen

1. La diferencia de tamaños de fragmentos conservados del ADN dentro del CMH constituye una diversidad genética no apreciada generalmente. Hemos desarrollado un modelo para describir los fragmentos variables en tamaño y que también pueden ser población-específicos. Existen bloques pequeños compuestos de dos o más alelos de loci en ligamiento que se pueden considerar como unidades genéticas. Estos bloques pequeños se unen y en algunos individuos forman bloques más grandes que miden hasta 1.5 MB (megabases) llamados HEC (haplotipos extendidos conservados).
2. El estudio de bloques genéticos que varían en diferentes poblaciones sirve para el mapeo de riesgos genéticos de enfermedades que incluyen las autoinmunes e infecciones.
3. Los bloques genéticos, en general y especialmente en el CMH, definen diversidad genética con relación a la etnicidad de la población estudiada que incluyen los estudios de poblaciones que resultan de mezclas de poblaciones ancestrales. Como la frecuencia de los alelos del CMH está influida por la evolución de las poblaciones o etnias, el grado de mezcla usando polimorfismos del CMH puede hacer necesario el estudio de mezclas de poblaciones ancestrales con más precisión, usando además otros marcadores genéticos del genoma. En la práctica, hoy se utilizan las secuencias repetidas cortas en tándem (STRs), variantes del cromosoma Y analizadas como STR y también por estudio de secuencia, y variantes del ADN de la mitocondria.

Bibliografía

1. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, et al. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **i**: 152-156.
2. Ahmed AR, Yunis JJ, Marcus-Bagley D, et al. Major histocompatibility complex susceptibility genes for dermatitis herpetiformis compared with those for gluten-sensitive enteropathy. *J Exp Med* 1993; **178**: 2067-2075.
3. Azocar J, Clavijo OP, Yunis EJ. MHC class II genes in HCV viral clearance of hepatitis C infected Hispanic patients. *Hum Immunol* 2003; **64**: 99-102.
4. Campbell KS, Hii G. Signal Transduction by Inhibitory Receptors on Human Natural Killer Cells. www.fccc.edu/research/reports/current/campbell.html 1998.
5. Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernandez-Viña MA. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum Immunol* 2001; **62**: 1009-1030.
6. Crowle AJ, Elkins N. Relative permissiveness of macrophages from black and white people for virulent tubercle bacilli. *Infect Immun* 1990; **58**: 632.
7. Delgado JC, Tsai EY, Thim S, Baena A, Boussiotis VA, Reyes JM, Sath S, Grosjean P, Yunis EJ, Goldfeld AE. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia 2002: **11**: 7576-7581.
8. Gjertson DW, Lee S-H. HLA-A/B and DR/DQ allele level haplotype frequencies. In: Gjertson DW, Terasaki PI, eds. *HLA 1998*. Lenexa, KS: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1998: 365-450.
9. Janeway CA. *Immunology* 2001.
10. Larsen CE, Xu J, Lee S, Dubey DP, Uko G, Yunis EJ, Alper CA. Complex cytokine responses to hepatitis B surface antigen and tetanus toxoid in responders, nonresponders and subjects naive to hepatitis B surface antigen. *Vaccine* 2000; **18**: 3021-30.
11. Lockart DJ, Winzeier EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; **405**:827-835.
12. Porque Somos Así. Emilio Yunis. Servicios Medicos Yunis-Turkey, Bogota, Colombia.
13. Raun D, Awdeh Z, Yunis EJ, Alper CA, Gabbay KH. Extended major histocompatibility complex haplotypes in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1984; **74**: 449-454.
14. Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski J, Carrington M, Thomas DL. HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *J Virol* 2002; **76**: 4792-7.
15. Venter JC, et al. The sequence of human genome. *Science* 2001; **291**:1305-1351.
16. Venter JC, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001 ; **291**: 1305-1351.
17. Wilton AN, Cobain TJ, Dawkins RL. Family studies of IgA deficiency. *Immunogenetics* 1985; **21**: 333-342.
18. Yu P, Kruskall MS, Yunis JJ, Knoll JHM, Uhl N, Alosco S, Ohashi M, Clavijo O, Husain Z, Yunis E, Yunis J, Yunis EJ. Disputed Maternity Leading to Identification of Tetragametic Chimerism. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1545-1552.
19. Yunis GL, Amos DB. Three closely linked genetic systems relevant to transplantation. *Proc Nat Acad Sci* 1971; **8**: 3031-3035.
20. Yunis EJ, Larsen CE, Fernández-Viña M, Awdeh ZL, Romero R, Hansen JA, Alper CA. Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. *Tissue Antigens* 2003; **62**: 1-20.
21. Yunis JJ, Yunis EJ, Yunis E. Genetic relationship of the Guambiano, Paez, and Ingano Amerindians of Southwest Colombia using major histocompatibility complex class II haplotypes and blood groups. *Hum Immunol* 2001; **62**: 970-978.