



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Caracterización molecular y análisis evolutivo  
del Complejo Mayor de Histocompatibilidad  
Clase I (*MHC-I*) en Primates del Nuevo Mundo  
(*Platyrrhini*)**

**Juan Sebastian Lugo Ramos**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología  
Bogotá, Colombia  
2014

**Caracterización molecular y análisis evolutivo  
del Complejo Mayor de Histocompatibilidad  
Clase I (*MHC-I*) en Primates del Nuevo Mundo  
(*Platyrrhini*)**

**Juan Sebastian Lugo Ramos**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Biología**

**Director:**

**Luis Fernando Cadavid G. MD, Ph. D.**

Línea de investigación en genética.

Grupo de inmunología evolutiva e inmunogenética.

Universidad Nacional de Colombia.

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.

Bogotá, Colombia.

2014

“

*Digamos que el mundo es una figura, hay que leerla.*

*Por leerla entendamos generarla.”*

***Rayuela, Julio Cortázar.***

*“Si se nos acaba la biología,*

*se nos acaba todo.”*

***Zayid, Ana caótica.***

# AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de este proyecto estuvieron muchas personas involucradas directa o tangencialmente y por eso aunque el agradecimiento sea tanto, las palabras no alcanzarán.

Quisiera empezar por agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, por ser el lugar donde las buenas ideas siempre salen adelante y donde me formé no sólo en lo académico sino en lo político, moral y personal.

Quisiera agradecer a varios estamentos de La universidad por su apoyo financiero: la Dirección de Investigaciones sede Bogotá (DIB) y la facultad de ciencias y el programa de Auxiliar docente que financió parte de mis estudios..

Al profesor Luis Fernando Cadavid por haber dado cabida a mis ideas, discutir las y alentarlas. Además del análisis y edición de este documento.

Al grupo de inmunología por sus incesantes aportes, en especial a Johana Fajardo, Henry Rodríguez y Alejandra Zárate, con quienes compartí angustias y discusiones.

Por último quiero agradecer a mi familia y a María Paula Latorre, por ser siempre el apoyo moral cuando más lo necesitaba durante el desarrollo de este proyecto.

# RESUMEN

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (MHC-I) codifica para proteínas de membrana que presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T citotóxicos que inician la respuesta inmune celular [1]. El MHC-I se ha conservado en primates catarrinos, compartiendo los clásicos *MHC-A*, y *-B*, y los no-clásicos *-E*, *-F* y *-G*. Por su parte, los primates platirrininos expresan un complemento diferente de loci clásicos, llamado MHC-G-Like[2], aunque también hay evidencia genómica de varios loci relacionados a *MHC-B* de catarrinos. Para contribuir a un mejor entendimiento del MHC-I en los monos del Nuevo Mundo, en este trabajo se analizó 1) la estructura genómica del MHC-I en 4 especies, 2) el secuenciamiento y evolución de cDNAs de MHC-I en 10 especies y 3) se evaluó el polimorfismo de estos loci en una muestra de 12 individuos de la especie *Cebus albifrons*. Los resultados indican que los Platirrininos expresan genes homólogos al *MHC-B* de catarrinos y que estos, junto con los *MHC-G-Like*, muestran una alta tasa de duplicación génica, una rápida diferenciación género-específica y niveles de polimorfismo altos al menos en la especie *C. albifrons*.

**Palabras clave: MHC, Primates del Nuevo Mundo, Evolución, Selección Natural.**

# ABSTRACT

The Major Histocompatibility Complex class I (MHC-I) encodes for highly polymorphic membrane proteins that present antigenic peptides to cytotoxic T lymphocytes to initiate the cellular immune response [1]. The MHC-I has remained well conserved in Catarrhini primates, these species share the classical loci *MHC-A* and *-B*, and the non-classical loci *MHC-E*, *-F*, and *-G*. Platyrrhini primates, in turn, express a different classical MHC-I complement named MHC-G-Like, [2], however there are several loci related to the Catarrhini *MHC-B* locus. To contribute to a better understanding of the MHC-I in New World primates, in this work it was analyzed 1) the genomic structure of the MHC-I region in 4 species, 2) MHC-I cDNAs from 10 Platyrrhini species and 3) Polymorphism levels of MHC-I in the species *Cebus albifrons*. The results indicate the Platyrrhini express loci homologous to Catarrhini *MHC-B*, and together with *MHC-G-Like*, showed a high rate of gene duplication, rapid genus-specific diversification and high polymorphism in the species *Cebus albifrons*.

**Key words: MHC, New World Primate, Evolution, Natural Selection.**

# Índice de contenido

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>III. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
1. Biología del MHC-I.....	13
1.1 Estructura del MHC-I.....	13
1.2 Procesamiento del antígeno presentado por el MHC-I.....	13
1.3 Interacción del MHC-I con células del sistema inmune. ....	15
1.4 Polimorfismo del MHC-I.....	16
2. Genómica del MHC-I.....	17
2.1 La región genómica del MHC en Humanos. ....	17
2.2 Genómica comparativa del MHC-I en vertebrados. ....	19
2.3. Evolución del MHC-I en Primates.. ....	19
2.3.1. Strepsirrhini.....	21
2.3.2. Homínidos y Monos del Viejo Mundo.....	22
2.3.3 Primates del Nuevo Mundo.....	23
<b>IV. METODOLOGÍA</b> .....	<b>27</b>
1. Análisis genómico del MHC-I. ....	27
2. Obtención de muestras.....	27
3. Extracción de RNA y RT-PCR.....	28
4. Análisis Evolutivo y filogenético.....	28
5. Evaluación de selección natural y otros mecanismos evolutivos. ....	29
6. Predicción de péptidos. ....	29
7. Predicción de interacción MHC- KIR.....	29
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
1. Evolución genómica del MHC clase I en Primates del Nuevo Mundo.....	31
1.1 Los Primates del Nuevo Mundo poseen regiones homólogas a los bloques alfa y beta del MHC-I humano. ....	31
1.2. Los genes del MHC-I identificados en las secuencias genómicas son similares a MHC-F, MHC-G-like y MHC-B.....	34
1.2.1 Genes relacionados a MHC-F.....	36
1.2.2. Genes relacionados a MHC-G-like.....	36
1.2.3. Genes relacionados a MHC-B o MHC-B-like.....	38
1.3. Los diferentes linajes de MHC-F, MHC-G-like y MHC-B-like se identifican también con retroelementos ubicados en la región 5´.....	38
1.4 Sintenia y comparación genómica.....	42

2. Los platirrininos transcriben genes MHC-G-like, -B y -E.....	46
2.1 Los MHC-I expresados en Platyrrhini, son semejantes a MHC-G, -B y -E de Catarrhini.....	46
2.2 Duplicaciones y pérdidas en la evolución del MHC-G-like.....	49
2.3 Evolución del MHC-B en platirrininos. ....	51
2.4 Los diferentes linajes de MHC-I en Primates del Nuevo Mundo diversifican la región de unión al péptido por selección positiva. ....	53
3. Polimorfismo de los genes MHC-B y MHC-G-like de Cebus albifrons.....	57
3.1 Caracterización de alelos en la especie Cebus albifrons.....	57
3.2. MHC-G-like y MHC-B tienen duplicaciones recientes en la especie C. albifrons.. ....	59
3.3. La selección natural positiva diversifica la región de unión al péptido en linajes ancestrales.....	62
3.4. Los alelos de C. albifrons también presentan recombinaciones como forma de generar polimorfismo.....	65
4. Algunas predicciones relacionadas con el MHC-I en Primates del Nuevo Mundo.....	67
4.1 Predicción de interacciones MHC-KIR.....	67
4.2 Predicción de péptidos.....	72
<b>VI.DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
Los loci MHC-B y MHC-G-like muestran diferentes mecanismos de duplicación. ....	75
La reconstrucción de los posibles ancestros de cada uno de los clados, muestra diferencias en las tasas de duplicación de MHC-G-like y MHC-B.....	77
Efectos de la pérdida de transcritos en las especies de Callithricidae.....	79
Polimorfismo en C. albifrons y predicciones funcionales.....	80
<b>VII.CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>83</b>



# Lista de figuras

Figura 1. Estructura de las proteínas del MHC .....	14
Figura 2. Función e interacción del MHC-I con elementos del sistema inmune .....	15
Figura 3. Región genómica del MHC clase I en humanos.....	18
Figura 4. Comparación de región genómica del MHC Clase I en Vertebrados .....	20
Figura 5. Loci de MHC-I presentes en diferentes grupos de primates .....	22
Figura 6. Taxonomía de Primates del Nuevo Mundo (Platyrrhini).....	24
Figura 7. Ubicación aproximada de los BACs y scaffolds encontrados en la búsqueda de secuencias genómicas de MHC-I en platirrininos.....	33
Figura 8. Filogenia de genes encontrados en regiones las regiones genómicas del MHC-I de platirrininos. ....	37
Figura 9. Retroelementos flanqueantes en ubicación 5' de los genes MHC-I de platirrininos. ....	40
Figura 10. Comparación genómica de las regiones homólogas de MHC-I. ....	44
Figura 11. Clasificación de los transcritos de MHC-I obtenidos .....	47
Figura 12. Relaciones filogenéticas de MHC-G-like.....	50
Figura 13. Relaciones filogenéticas de MHC-B-like. ....	52
Figura 14. Análisis de Selección de MHC-G-like y MHC-B-like por codones.....	55
Figura 15. cDNAs encontrados en 12 individuos de Cebus albifrons. ....	58
Figura 16. Filogenia de los cDNAs del MHC-I de C. albifrons. ....	61
Figura 17. Análisis de selección natural del MHC-I de C. albifrons. ....	63
Figura 18. EVF (Evolutionary Fingerprinting) de MHC-G grupo específicos y locus ancestral. ....	64
Figura 19. Recombinación en alelos de C. albifrons .....	65
Fig 20 Validación de la predicción de interacción y aplicación a pares de Platyrrhini.....	69
Figura 21. Predicción de interacción en las proteínas.....	71
Figura 22. Topología NJ obtenida únicamente con las posiciones del PBR.....	73
Figura 23. Similaridad de los péptidos presentados.....	74
Figura 24. Modelos de duplicación en los loci MHC-B y MHC-G-like. ....	76
Figura 25. Modelo de evolución del bloque Alfa (MHC-G-LIKE) .....	78
Figura 26. Modelo de evolución del bloque beta (MHC-B).....	79

# I. INTRODUCCIÓN

Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (*MHC-I* por sus siglas en inglés) presentan péptidos endógenos a los linfocitos T citotóxicos (CTL) para iniciar una respuesta inmune celular[1]. El MHC-I también interactúa con células Natural Killer (NK) mediante su unión con diversos receptores activadores e inhibitorios que regulan la función citotóxica de estas células. Esto hace del *MHC-I* un sistema de gran importancia tanto como iniciador de la respuesta inmune adaptativa como de la respuesta inmune innata [4].

El MHC-I en humanos se localiza en el cromosoma 6p21 y codifica 6 moléculas presentadoras de péptidos (*MHC-A*, *-B*, *-C*, *-E*, *-F* y *-G*) y varias proteínas no relacionadas con el MHC. De acuerdo con su polimorfismo y distribución tisular, las proteínas del MHC-I se clasifican en clásicas y no-clásicas. Las primeras incluyen *MHC-A*, *-B* y *-C*, tienen un alto polimorfismo y se expresan en todas las células nucleadas. Las segundas incluyen *MHC-E*, *-F* y *-G*, tienen un polimorfismo bajo y se expresan solo en ciertos tejidos[5]. La región genómica del MHC-I humano se ha dividido en tres bloques contiguos; el bloque alfa hacia la región telomérica que contiene los genes *MHC-F*, *MHC-G* y *MHC-A*; el bloque gama en la región central que contiene únicamente el gen *MHC-E* y bloque beta hacia la región centromérica que contiene los genes *MHC-B* y *MHC-C*[6].

El MHC-I se ha mantenido relativamente bien conservado en primates catarrinos (humanos, simios y monos del Viejo Mundo). Ciertamente, los homínidos (humanos y simios) expresan el mismo complemento de genes MHC-I clásicos y no clásicos [5], [7]. Por su parte, los monos del Viejo Mundo (familia Cercopithecidae) no tienen el locus *MHC-C* y sus loci *MHC-A* y *-B* se han duplicado repetidamente[8][9]. En los monos del Nuevo Mundo (Infraorden: *Platyrrhini*) hasta ahora estudiados no hay evidencia de la expresión de genes MHC-I clásicos homólogos a aquellos de catarrinos (*MHC-A*, *-B*, y *-C*), pero expresan al menos 3 genes clásicos similares (aunque no ortólogos) a *MHC-G*, por lo que se les ha denominado *MHC-G-like*. Además de estos, los platirrininos expresan genes no clásicos homólogos a *MHC-E* y *-F*[5][10][11].

Un reciente análisis genómico del bloque beta del MHC-I en el tití común *Callitrix jacchus* (Platyrrhini; Cebidae) mostró la presencia de 9 genes similares a *MHC-B*, 5 de los cuales no presentan alteraciones evidentes que prevengan su transcripción, mientras que los otros 4 son pseudogenes [3]. No obstante, un subsecuente estudio en esta especie no encontró evidencia de transcripción en ninguno de los genes *MHC-B*, aunque sí de los loci *MHC-G-like*, como se ha establecido en todas las especies de platirrinos hasta ahora estudiados [12]. Desafortunadamente, no existen análisis genómicos de los otros dos bloques del MHC-I en ninguna especie de platirrinos, lo que ha prevenido tener un conocimiento más completo de este sistema, tanto de su estructura genómica y sus patrones de transcripción, como de sus mecanismos evolutivos. El presente trabajo busca contribuir a entender en mejor detalle la estructura genómica del MHC-I y su variación en monos del Nuevo Mundo, así como también evaluar la actividad transcripcional de los distintos loci y sus niveles de polimorfismo.

Para conseguir estos objetivos se desarrollaron las siguientes estrategias: 1) basado en datos públicos obtenidos de proyectos de secuenciación genómica, se realizó una comparación del bloque alfa del MHC-I entre 4 especies y del bloque beta entre dos especies de monos del Nuevo Mundo; 2) se secuenciaron los transcritos del *MHC-I* en 10 especies de platirrinos de las familias *Atelidae* y *Cebidae*; 3) se evaluó el nivel de polimorfismo de los loci del MHC-I a nivel de cDNA en 12 individuos del mono capuchino *Cebus albifrons*; y por último, 4) se realizaron algunas predicciones funcionales en cuanto a posibles péptidos de unión al MHC-I y la interacción de los MHC-I con receptores de células NK de *Platyrrhini* descritos por nuestro grupo previamente.

Los resultados de este trabajo establecen inequívocamente que el MHC-I en monos del Nuevo Mundo está constituido por dos grupos de genes de número variable, *MHC-G-like* y *MHC-B-like*, los cuales comparten un ancestro común con aquellos de la región alfa y beta, respectivamente, del MHC-I de catarrinos. Ambos grupos de genes se han diversificado continuamente por duplicación génica que típicamente coincide con la divergencia entre géneros o especies. Esta intensa actividad duplicativa se acompaña de procesos de pseudogenización, acorde con un modelo evolutivo de nacimiento y muerte de genes. Los genes activos son altamente polimórficos y son competentes para presentar una amplia diversidad de péptidos, así como también de interactuar con los receptores de células NK.

## II. OBJETIVOS

### *Objetivo General.*

- Caracterizar los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (*MHC-I*) en especies representantes de las familias de primates del Nuevo Mundo *Atelidae*, *Cebidae* y *Aotidae*.

### *Objetivos Específicos*

- Estandarizar la amplificación por RT-PCR, clonación y secuenciación los genes del *MHC-I* transcritos para las familias arriba mencionadas.
- Reconstruir la historia evolutiva de los genes *MHC-I* en las especies de Primates del Nuevo Mundo mediante análisis filogenéticos.
- Identificar los mecanismos de diversificación y de evolución molecular del *MHC-I* en Primates del Nuevo Mundo.
- Identificar patrones de evolución genómica del *MHC-I* en Primates mediante comparaciones de secuencias de la región, disponibles en bases de datos públicas.

# III. MARCO TEÓRICO

## ***1. Biología del MHC-I.***

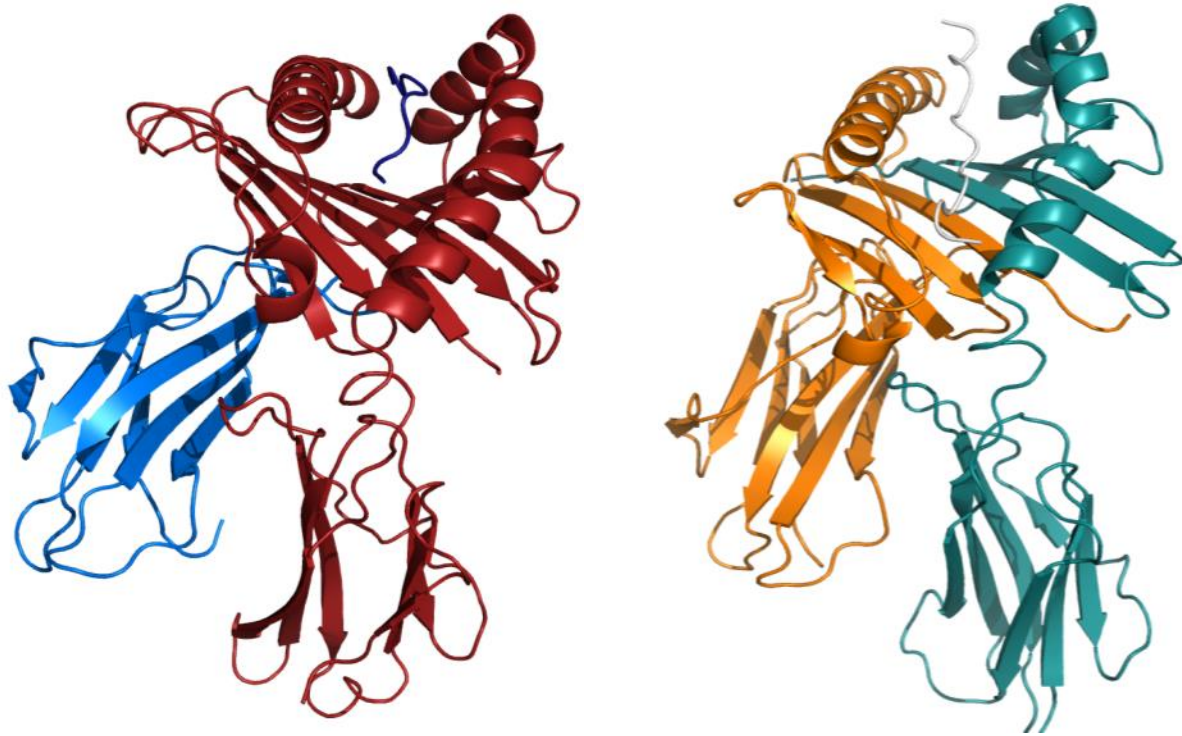
### ***1.1 Estructura del MHC-I.***

El complejo mayor de Histocompatibilidad (MHC) codifica para proteínas de membrana de expresión codominante que presentan péptidos antigénicos a los receptores de células T (TcR). Las moléculas del MHC se dividen en clase I y clase II de acuerdo a diferencias funcionales y estructurales: las moléculas del MHC clase I (MHC-I) se expresan en todas las células nucleadas y presentan antígenos a los linfocitos T citotóxicos (CD8+) para activar la respuesta inmune celular [1]. Están compuestas de una cadena transmembranal (cadena alfa) constituida por tres dominios extracelulares, y asociada a otra cadena no membranal llamada beta2-microglobulina (Figura 1A). Los dos dominios distales a la membrana de la cadena alfa (dominios alfa-1 y -2) forman el sitio de unión al antígeno, mientras que el dominio restante (alfa-3) pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas e interactúa con la beta2-microglobulina para formar un dímero estable.

Por su parte, las moléculas del MHC clase II (MHC-II) se expresan únicamente en células presentadoras del antígeno (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) y presentan antígenos peptídicos a los linfocitos T ayudadores CD4+ [1]. Estas proteínas se componen de una cadena alfa y una cadena beta, ambas transmembranales y con dos dominios extracelulares (Figura 1B). Los dominios alfa-1 y beta-1 forman el sitio de unión al antígeno, mientras que los dominios alfa-2 y beta-2 interactúan con el coreceptor CD4 de los linfocitos T ayudadores.

### ***1.2 Procesamiento del antígeno presentado por el MHC-I.***

Las moléculas del MHC-I presentan péptidos de un tamaño promedio de 9 aminoácidos provenientes de proteínas intracelulares [13], [14]. Estos péptidos endógenos derivan del proceso de reciclaje proteico en células normales, así como también de parásitos intracelulares o de proteínas oncogénicas.



*Figura 1. Estructura de las proteínas del MHC.* A) Estructura del MHC-I: se muestra la cadena alfa en rojo, el péptido unido al sitio de unión al antígeno en color azul oscuro y la beta2-microglobulina en azul claro (PDB: 2CLR). B) Estructura del MHC-II: se muestra la cadena alfa en naranja, la cadena beta en verde y el péptido unido al sitio de unión al antígeno en blanco (PDB: 2NNA).

Brevemente, el procesamiento de los antígenos endógenos se divide en dos pasos: 1) la generación de los péptidos por parte del proteosoma 20S (llamado también inmunoproteosoma) que reconoce proteínas ubiquitinadas y marcadas para su degradación. Los péptidos que salen del proteosoma son transportados al interior del retículo endoplasmático mediante una proteína transportadora llamada TAP, donde sucede, 2) el ajuste de esos péptidos en el sitio de unión al antígeno de las moléculas de MHC-I que están siendo sintetizadas en ese compartimiento. La unión del péptido al sitio de unión al antígeno requiere de la interacción de diversas proteínas colectivamente llamadas complejo de carga de péptido (PLC). Por último, el complejo péptido - MHC-I (pMHC) se transporta a la superficie celular vía el sistema de Golgi[13], [14].

### 1.3 Interacción del MHC-I con células del sistema inmune.

El complejo pMHC interactúa con los receptores de células T (TcR) de los linfocitos CD8+ y con los receptores de células Natural Killer (NK). Cuando el TcR interactúa con un pMHC-I cuyo péptido viene de una célula en estado normal (péptidos propios), la célula T no inicia ninguna respuesta. Por el contrario, cuando el TcR reconoce algún péptido extraño (proveniente de una célula propia alterada), la célula T se activa generando apoptosis en la célula blanco, mediante la activación de las caspasas bien sea por la interacción Fas-FasL o por la secreción de las citotoxinas perforina y granzimas B (Figura 2).

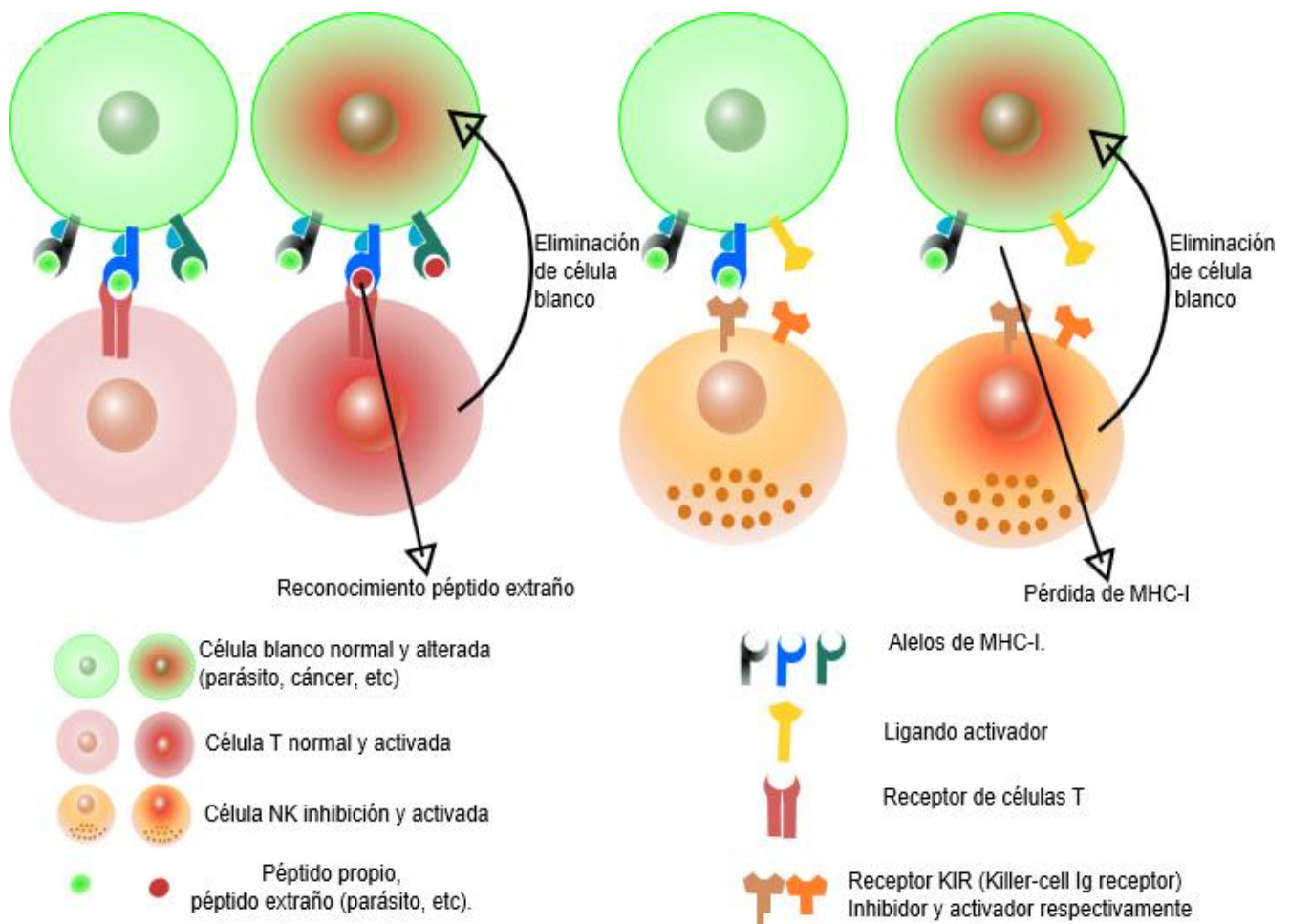


Figura 2. Función e interacción del MHC-I con elementos del sistema inmune. La interacción de una célula normal y una afectada con células T citotóxicas o células NK. La respuesta en la primera se da por el reconocimiento de un antígeno extraño y la segunda por la pérdida de interacción con el MHC-I.

La interacción entre MHC-I y los diversos receptores de las células Natural Killer (NK) genera señales inhibitorias o activadoras cuyo balance determina la respuesta de la célula NK [15]. La interacción de los receptores inhibitorios de células NK con las moléculas del MHC-I conduce a anergia. En condiciones de estrés celular causado por virus o transformación tumoral, las moléculas del MHC-I disminuyen su expresión, interrumpiendo la señalización inhibitoria y promoviendo la señalización activadora que induce apoptosis la célula blanco por parte de la célula NK, mediante mecanismos similares a los de los linfocitos T CD8+ (Figura 2).

Además de su función en el sistema inmune, el MHC-I y los receptores de células NK tipo KIR, juegan un papel relevante en la reproducción. Estudios en humanos muestran que las células del trofoblasto (células del feto que invaden el útero materno) dejan de expresar algunos genes de MHC-I de origen paterno evitando así ser reconocidos por el sistema inmune materno [16]. Sin embargo, las células NK se activan por la interacción con células que pierden la expresión de MHC-I. Para evitar la citotoxicidad mediada por células NK, los MHC-I no clásicos (MHC-G, y -E) de las células del trofoblasto interactúan con los receptores de células NK inhibitorios, inactivando la acción de estas células sobre el trofoblasto. De esta forma, el crecimiento y estructuración de la placenta requiere un estricto balance en la interacción del MHC-I con los receptores de las células NK de la placenta[17].

#### ***1.4 Polimorfismo del MHC-I.***

El MHC-I es el sistema genético más polimórfico en vertebrados [18]. Por ejemplo, en humanos los loci *MHC-A*, *-B* y *-C* tienen 2.244, 2.934 y 1.788 alelos respectivamente, de acuerdo con la base de datos IMGT [19]. La variación entre alelos de un locus dado tiende a ocurrir en los exones que codifican el sitio de unión al antígeno (exones 2 y 3) y más específicamente, en los residuos que interactúan con el péptido. El polimorfismo del MHC, se genera por varios mecanismos, dentro de los que se encuentran: 1) *Patrones de sustituciones nucleotídicas*: este fenómeno se ha postulado como una de las formas de generar polimorfismo, pues se ha evidenciado que la selección natural promueve la diversificación de los genes del MHC-I para aumentar el rango de péptidos que puedan ser presentados en una población [1]. Esto se evidencia por el exceso de sustituciones nucleotídicas no sinónimas (dN) en los exones que codifican el sitio de unión al antígeno. 2) *Recombinación y conversión génica*:



fenómenos de recombinación no homóloga inter e intra locus [18]. 3) *Duplicación*: El MHC-I frecuentemente se encuentra duplicado, fenómeno que genera variación e incluso pérdida de ortología entre grupos de genes [2].

Este polimorfismo se mantiene por uno o más de los siguiente mecanismos: 1) *Sobredominancia (o ventaja del heterocigoto)*: Heterocigotos para el MHC-I tienen ventajas selectivas sobre los homocigotos debido a la capacidad de presentar una mayor diversidad en los péptidos [18]. 3) *Ventaja del alelo raro*: En este escenario, alelos raros aumentan en frecuencia como consecuencia del surgimiento de nuevos patógenos o nuevas variantes de patógenos existentes, creando un continuo cambio en las frecuencias alélicas de los genes del MHC [1]. Existen otras teorías que están ligadas a la reproducción y al *fitness*. 4) *Prevención de endogamia*: En esta hipótesis se postula la posibilidad de selección sexual con base en la escogencia de la pareja evitando seleccionar aquellos individuos con alelos semejantes a los propios [18]. 5) *Fitness basado en enfermedades*: la escogencia de un individuo para aparearse con alelos de MHC-I diferentes a los propios otorga mayor *fitness* a la progenie frente a enfermedades [18].

## **2. Genómica del MHC-I**

### **2.1 La región genómica del MHC en Humanos.**

El MHC clase I en humanos se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21) dentro de una región llamada Complejo Mayor de Histocompatibilidad extendido (xMHC), que abarca aproximadamente 7.6 Mpb y que comúnmente se clasifica en cinco subregiones organizadas desde el telómero hasta el centrómero: clase I extendida, clase I, clase III, clase II y clase II extendida. En todas las subregiones se encuentran variadas familias de genes y pseudogenes no relacionadas con el MHC [20].

En la región de MHC Clase I extendida se encuentran 66 genes y 11 pseudogenes de Histonas, un grupo de genes de transportadores de solutos, 157 genes de tRNAs, un grupo de genes de receptores vomeronasales, y por último, 14 genes y 20 pseudogenes de receptores olfativos. En la subregión clase III se encuentran genes que codifican citoquinas proinflamatorias del tipo TNF(Tumor Necrosis Factor)

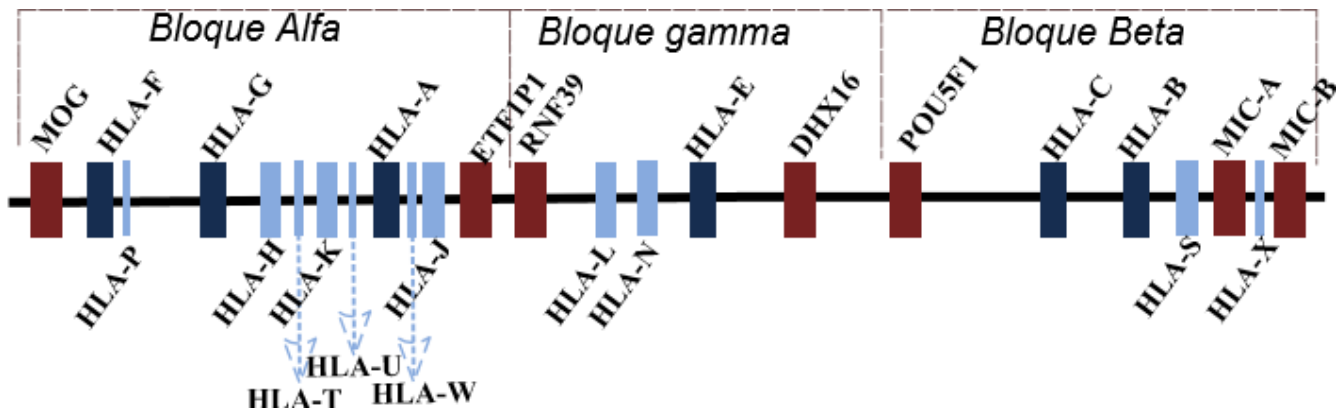


Figura 3. Región genómica del MHC clase I en humanos. Los rectángulos muestran la posición aproximada de diferentes genes: en rojo se representan los genes marco, en azul oscuro los genes del MHC-I y en azul claro los pseudogenes. Se señalan también los bloques alfa, gama y beta que componen esta región.

proteínas ancladas por GPI con una probable función inmune, proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins) y las proteínas C4 y C2 del sistema complemento. La subregión de clase II y clase II extendida, además de albergar a los genes y pseudogenes de MHC-II, contiene también algunos genes asociados al procesamiento de antígenos como TAP1, TAP2, PSMB9 y PSMB8 [20].

En la subregión de clase I (Figura 3) se encuentran los 6 genes (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-E*, *-F*, y *-G*) y 11 pseudogenes (*HLA-H*, *-P*, *-V*, *-K*, *-T*, *-U*, *-W*, *-J*, *-L*, *-N*, y *-S*) del MHC-I. Los genes del MHC-I se clasifican en dos grupos: clásicos y no clásicos [2]. Los *MHC-I* clásicos (*HLA-A*, *-B*, *-C*) son altamente polimórficos, se expresan en todas las células nucleadas y tienen un alto nivel de expresión. Los *MHC-I* no clásicos (*HLA-E*, *-F*, *-G*) son de polimorfismo limitado, están restringidos a algunos tejidos y tienen bajos niveles de expresión. En la subregión de clase I se encuentran también genes y pseudogenes relacionados al MHC, como *MICA* y *MICB* (Major Histocompatibility class I-like), pseudogenes *MIC* (*MICC/D/E/F/G*), y pseudogenes del HCG (HLA Complex Group) [20]. Existen además genes no relacionados con el MHC, como aquellos que codifican proteínas de dedos de zinc (TRIM), Corneodesmosina (CDSN) y genes que codifican proteínas que participan en distintos procesos celulares como la transcripción, reparación del DNA y regulación de la transcripción (PPP1R10, MDC1, TUBB, POU5F1). La subregión de MHC clase I se divide por conveniencia en tres bloques (Figura 3): el bloque alfa donde se encuentran los genes *HLA-F/G/A*, el bloque gama donde se

encuentra *HLA-E* y el bloque beta donde están los genes *HLA-B/C* y *MIC*. Estos bloques están delimitados por genes marco, no relacionados al MHC-I. El bloque alfa se delimita por los genes *MOG* y *ETF1P1*, el bloque gama por *RNF39* y *DHX16* y el bloque beta por los genes *POU5F1* y *MICB* [6].

## **2.2 Genómica comparativa del MHC-I en vertebrados.**

El MHC existe únicamente en vertebrados mandibulados y cada taxón ha estructurado esta región de una manera única mediante procesos de duplicaciones, deleciones y/o inserciones de genes o regiones multigénicas [6][21][22]. Comparaciones entre genomas de diferentes vertebrados muestran un complejo mosaico evolutivo consistente con un modelo de nacimiento y muerte de genes (Figura 4). Este proceso se evidencia claramente en anfibios, ya que existe un único locus de MHC-I para la familia *Pipidae* (donde se encuentra el organismo modelo *Xenopus laevis*), mientras que en la familia *Hylidae* y *Ranidae* existe un promedio de 3 loci putativamente expresados[23].

Este fenómeno se repite en Reptiles y Aves, donde las tortugas presentan alrededor de 2 loci. En el caso de aves domésticas como las gallinas se presenta una contracción del MHC, hasta el punto de ser considerado como el mínimo posible (1 loci), contrario a lo que sucede en las perdices que tienen hasta 8 loci de MHC-I. En mamíferos es de destacar la pérdida genes MHC-I no clásicos y re-arreglos cromosómicos en el cerdo, nuevas duplicaciones en roedores, y procesos de expansión y pseudogenización en Primates (Figura 4). Como se observa, el número de loci de *MHC-I* varía de especie a especie, dificultando la asignación de ortologías entre grandes grupos de animales [6][22].

## **2.3. Evolución del MHC-I en Primates.**

Los primates divergieron hace alrededor de 81,5 millones de años (ma) del grupo hermano de los colugos (*Dermoptera*), aunque el fósil más antiguo conocido data de 55-58 ma[24]. Su distribución geográfica incluye todos los continentes, excepto Australia, y se dividen en 4 grandes grupos: *Strepsirrhini* (lemures y galagos), *Tarsiiformes* (Tarsires), *Platyrrhini* y *Catarrhini*. A excepción del grupo de los *Tarsiiformes*, en todos los grupos ya se han realizado estudios sobre el *MHC-I* a diferentes escalas (Figura 5).

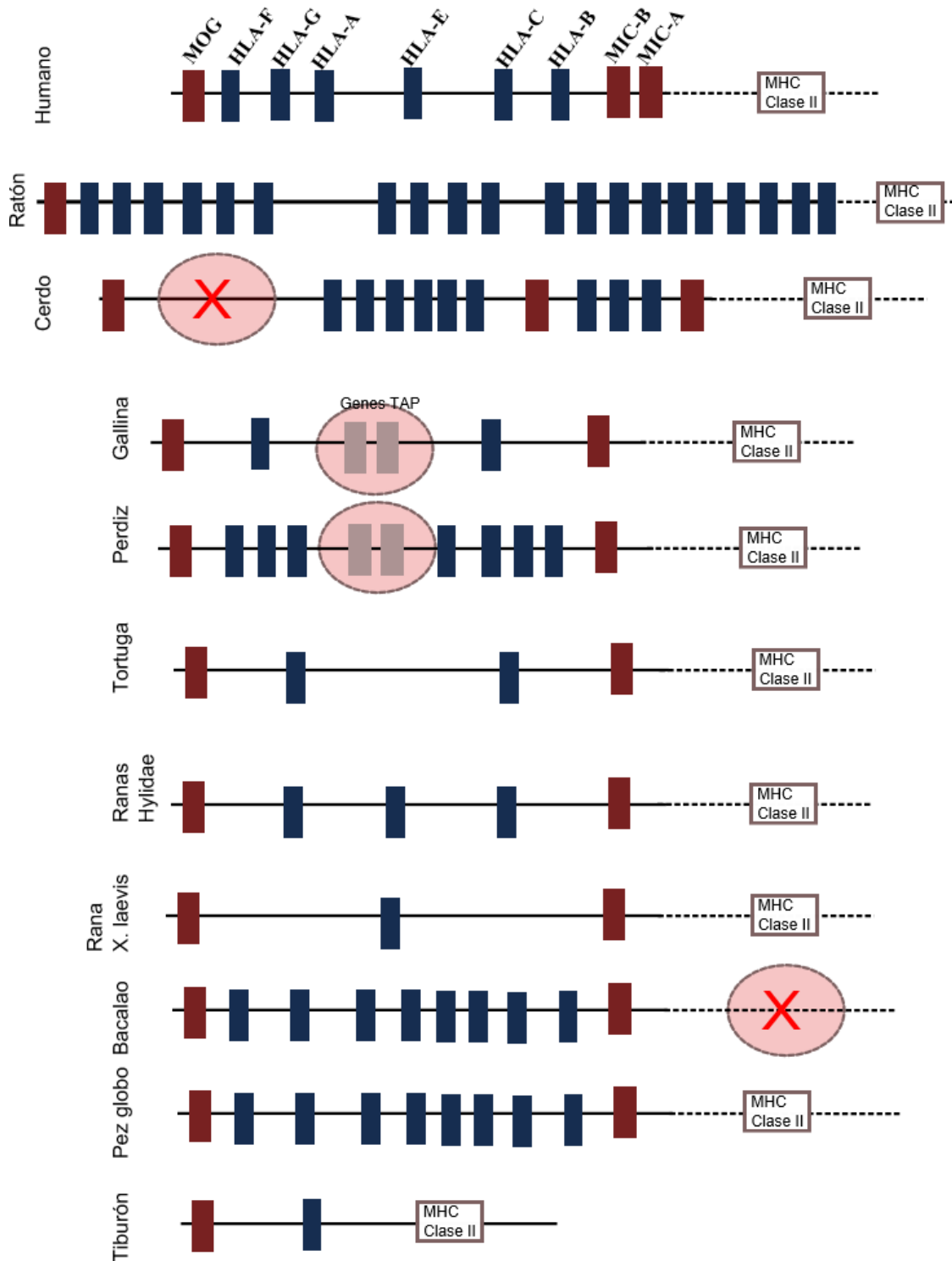


Figura 4. Comparación de región genómica del MHC Clase I en Vertebrados. Los rectángulos muestran la posición aproximada de diferentes genes: En rojo genes Marco, En azul Oscuro los genes MHC-I transcritos. Se señalan los grandes cambios que ocurren en algunos grupos de animales.

Al igual que en otros grupos de Vertebrados, el MHC-I en primates se caracteriza por una alta tasa de duplicaciones, deleciones, fusiones, re-arreglos cromosómicos e inserciones génicas [2]. Esto hace que en los análisis filogenéticos se puedan distinguir dos patrones de evolución: evolución trans-específica (la generación de alelos se da antes de la especiación), principalmente en especies que han divergido recientemente como el humano y el gorila, y evolución especie-específica o género-específica (la generación de alelos se da después de la especiación), que se observa al comparar taxones con mayor tiempo de divergencia (p.e *Callitrichinae* y *Macaca* sp) [25]. Aunque los genes clásicos de MHC-I en muchos casos no son ortólogos, los genes no clásicos muestran características de ortología al menos al comparar *Catarrhini* y *Platyrrhini*. Esto muestra que los genes no clásicos probablemente se originaron en el ancestro de todos los Primates y se mantuvieron por presiones selectivas distintas a aquellas de los genes clásicos (Figura 5).

### 2.3.1. *Strepsirrhini*

Los Strepsirrhini, son primates que divergieron hace alrededor de 74 ma. de los *Haplorrhini* (grupo hermano que contiene a los demás primates) [24]. Dentro de este grupo se encuentran los gálagos (géneros *Otolemur* y *Galago*), loris (géneros *Loris* y *Nycticebus*) y los lémures (géneros *Lemur*, *Daubentonia*, *Microcebus*). Cada grupo tiene una distribución geográfica específica: los gálagos se encuentran en África, los Loris en India y sureste de Asia y los lémures son exclusivos de la isla de Madagascar. Si bien en la distribución predominan África y Asia, existen algunos fósiles en Europa y Norte América [24].

Los genes de *MHC-I* en strepsirrhinos no son homólogos directos de los genes *MHC-A, -B, -C, -E, -F, -G* de humanos y están codificados en una región cromosómica diferente, que no hace parte del MHC ancestral [26]. Ciertamente, en la región homóloga se encuentran los genes marco y genes del MHC-I, pero estos últimos sólo existen como pseudogenes [26]. Así, el *MHC-I* de los strepsirrhinos se ha translocado y duplicado repetidamente, constituyendo un complemento de genes único y específico para este grupo, el MHC-W (Figura 5). Dentro del grupo, estos genes también han sufrido repetidas duplicaciones especie-específicas, perdiéndose en ocasiones las relaciones de ortología entre las distintas especies [27], [28].

### 2.3.2. Homínidos y Monos del Viejo Mundo.

El grupo de primates Catarrhini, que incluye a los *Hominoidae* (comúnmente llamados Homínidos o simios) y a los *Cercopithecidae* (monos del Viejo Mundo), divergió del grupo hermano de los *Platyrrhini* (monos del Nuevo Mundo) hace aproximadamente 40 ma [24]. Por su parte, los *Hominoidae* y los *Cercopithecidae* divergieron hace cerca de 29 ma [24]. Los *Hominoidae* incluye gibones, orangutanes, gorilas, chimpancés y humanos, y se encuentran distribuidos geográficamente en el aureste Asiático, las islas de Sumatra y Borneo y el centro de Africa, respectivamente. Los *Cercopithecidae* contienen más de 22 géneros, entre los que se destacan los Macacos (distribuidos ampliamente desde Japón al Norte de África), babuinos (centro y norte de África), mandriles (centro de África) y colobos (centro de Africa).

	Humano	Homínidos	Viejo Mundo	Nuevo Mundo	Lémures
A	●	●	x 7		
B	●	●	x 12	¿ ● ?	†
C	●	● ‡			
E	●	●	●	●	
F	●	●	●	●	†
G	●	●	†		†
AG			●		
G-Like				x N	
W					●



Figura 5. Loci de MHC-I presentes en diferentes grupos de primates. Un punto indica homología con humano. Cuando se conoce, se indica el número de loci. N denota un número variable de loci. † Indica que es un pseudogen. ‡ Presente en el 50% de la población.

La presencia y número de loci clásicos (*MHC-A*, *-B* y *-C*) es común a todos los homínidos, aunque existen particularidades en algunas especies [2]. Por ejemplo, la aparición de *Patr-AL* en chimpancé, relacionado con *MHC-A* de orangutanes[29]. Adicionalmente, *MHC-C* en orangutanes (*Pongo pygmaeus*) está ausente en aproximadamente el 50% de los haplotipos [30]. En los Cercopithecidae, el *MHC-I* presenta una amplia duplicación de loci. En el macaco Rhesus *M. mulatta* se encuentran alrededor de 19 genes *MHC-B* y 7 *MHC-A* (Figura 5), aunque sólo 9 de ellos se expresan[8]. Otra característica de este grupo es la ausencia de *MHC-C* y la pseudogenización de *MHC-G* con la consecuente aparición de *MHC-AG* producto de una fusión entre *MHC-G* y *-A* [31].

### 2.3.3 *Primates del Nuevo Mundo*

Los primates del infraorden *Platyrrhini* o monos del Nuevo Mundo se distribuyen en Centro y Sur América [32]. Generalmente se clasifican en 3 familias, *Cebidae*, *Atelidae* y *Pitheciidae*[32]. La familia *Cebidae* se divide en subfamilias *Cebinae* (géneros *Cebus* y *Saimiri*) y *Callithricinae* (géneros *Callithrix*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, entre otros). La familia *Atelidae* se divide en subfamilias *Alouattinae* (género *Alouatta*) y *Atelinae* (géneros *Ateles* y *Lagothrix*). Finalmente, la familia *Pitheciidae* se divide en *Pitheciinae* (género *Pithecia*) y *Callicebinae* (género *Callicebus*) (Figura 6).

El locus de *MHC-I* mejor caracterizado en primates del Nuevo Mundo es el *MHC G-like* (Tabla 1). Este locus es similar a *MHC-G* de catarrinos, sin embargo, dadas algunas características como el polimorfismo, duplicación en varios loci, y amplia distribución tisular, no se considera como un ortólogo directo del *MHC-G* y por tanto se nombra como *MHC-G-like* [33]. Uno de los primeros reportes de estos genes se dió en la especie *Saguinus oedipus*, los cuales mostraron un bajo polimorfismo, pues en 79 individuos caracterizados, únicamente se encontraron 11 alelos de *MHC-G-like* con 96% de similaridad[10]. Otra especie del mismo género, *Saguinus labiatus*, muestra patrones similares de polimorfismo, pues en 8 individuos se identificaron 8 alelos con un promedio de 97% de similaridad entre sí[34].

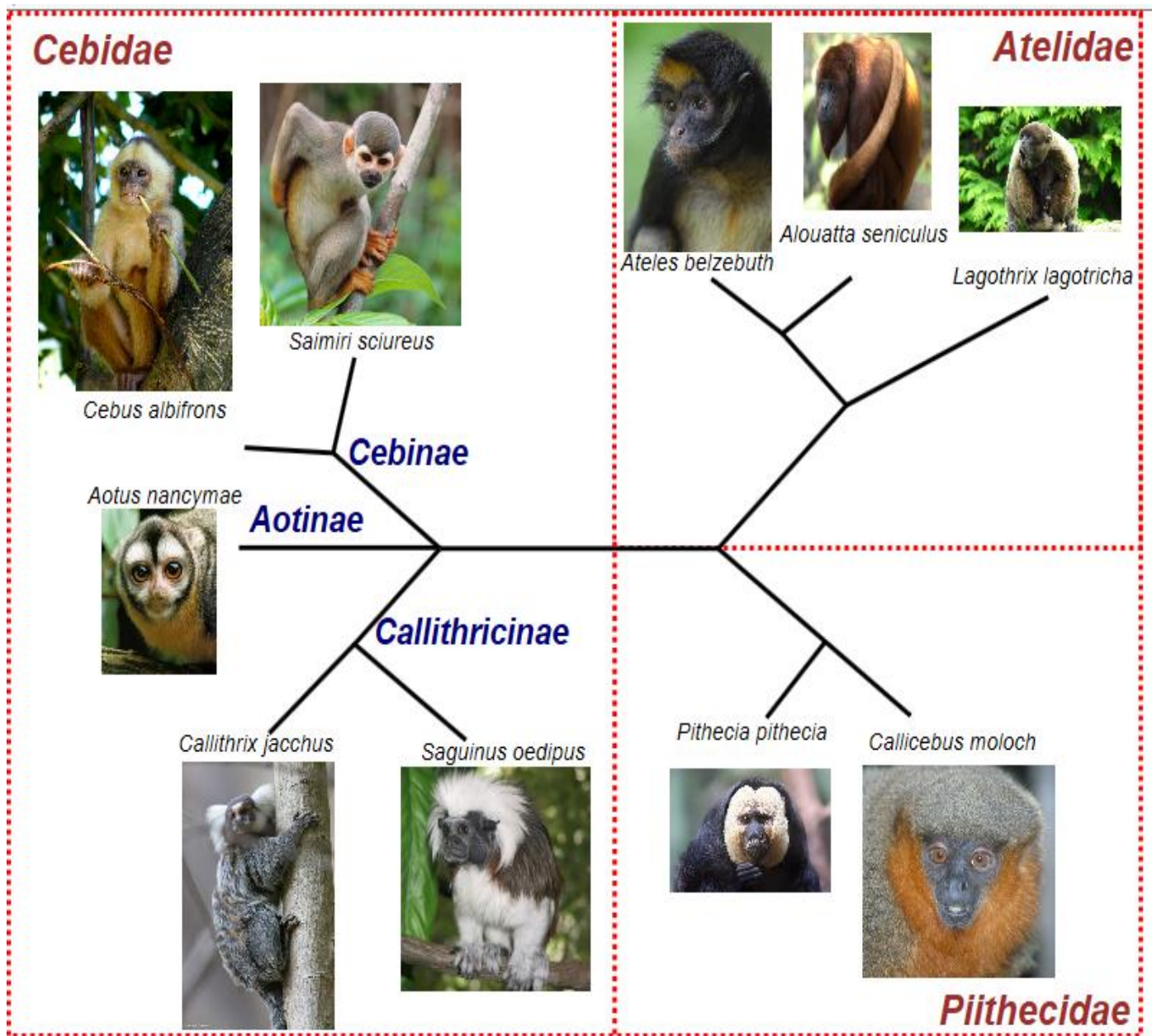


Figura 6. Taxonomía de Primates del Nuevo Mundo (Platyrrhini). Se encuentran representados los géneros de las especies que se estudiaron en el presente trabajo y sus relaciones filogenéticas. En este caso, se incluye el género *Aotus* dentro de la familia Cebidae.



En el género *Aotus*, los alelos del *MHC-G-like* parecen formar hasta 5 linajes diferentes, que pueden corresponder a distintos loci (Tabla 1). Para la especie *A. nigriceps*, se han descrito 9 alelos en 3 individuos, para *A. vociferans* 16 alelos en alrededor de 6 individuos y para la especie *A. nancymae* 23 alelos en 8 individuos [35], [36]. Esto indica que en *Aotus* el polimorfismo es comparable al de otras especies de primates. Estudios evolutivos de los loci *MHC-G-like* en varias especies de platirrininos han mostrado que estos genes evolucionan por un proceso acelerado de duplicaciones génicas que tienden a coincidir con los eventos de especiación [33]. Este proceso parece ser especialmente rápido en las especies de la subfamilia *Callitrichinae*, en donde especies que divergieron hace menos de 12 ma [37], expresan genes de *MHC-G-like* sin relaciones de ortología directa [33]. En otras subfamilias como *Atelinae* o *Cebinae*, ésta dinámica de duplicación génica parece ser más lenta, pudiéndose detectar ortólogos directos entre especies de diferentes géneros[33].

Si bien la gran mayoría de estudios sobre el MHC-I en platirrininos han detectado únicamente genes clásicos relacionados con *MHC-G-like*, existe evidencia de que estos primates también poseen homólogos de *MHC-B*. Una de estas evidencias proviene de la secuencia parcial de la región genómica del *MHC-I* en el tití común *Callithrix jacchus* [3]. En esta especie, la región homóloga del MHC se encuentra en el cromosoma 4 y la secuencia del bloque beta del MHC-I mostró la presencia de 9 genes similares a *MHC-B*, 5 de los cuales no tienen alteraciones evidentes que prevengan su transcripción y traducción, mientras que los otros 4 son claramente pseudogenes. Sin embargo, un estudio subsecuente en una población de esta misma especie, solo encontró transcritos de *MHC-G-like* y no de *MHC-B*, sugiriendo que aunque presentes en el genoma, son posiblemente inactivos [12]. Evidencia adicional sobre la presencia de *MHC-B* en platirrininos proviene de la identificación de transcritos únicos en cada una de las especies *Aotus nancymae*, *Aotus vociferans*, *Ateles belzebuth* y *Pithecia Pithecia* (Tabla 1), aunque se desconoce el número de loci y su nivel de polimorfismo [33], [36].

**Tabla 1. Loci de MHC-I reportados en monos del Nuevo Mundo.**

Especie	Loci B-like	Loci G-like	PS1	PS2	MHC-E	MHC-F
<i>Ateles belzebuth</i>	1*/3**	2-3*			1††	1**
<i>Ateles fusciceps</i>					1††	
<i>Pithecia pithecia</i>	1*	3*				
<i>Saimiri Sciureus</i>		2*			1††	
<i>Aotus trivirgatus</i>	3**	2-3*/3**		1		1**
<i>Aotus nancymae</i>	1†	3†				
<i>Aotus vociferans</i>	1†	3†				
<i>Aotus nigriceps</i>		3†				
<i>Saguinus mystax</i>			1	1		
<i>Saguinus labiatus</i>		2-3*	1	1		
<i>Saguinus oedipus</i>		2-3*	1	1	1††	
<i>Saguinus fuscicollis</i>		2-3*	1	1		
<i>Saguinus geoffroyii</i>			1	1		
<i>Leontopitecus rosalia</i>		1*				
<i>Callithrix jacchus</i>	9***	2-3*		1	1††	
<i>Cebus apella</i>	2**	3**				

El número indica la cantidad de loci y el símbolo la fuente de información. \*cDNA[33], \*\*DNA retroelementos[38], \*\*\* DNA genómico [3] †cDNA [35], [36], ††cDNA [11]

Una tercera línea de evidencia que sugiere la presencia de *MHC-B* en platirrininos deriva de un estudio de las secuencias de retroelementos que flanquean los genes *MHC-I* en la región 5' [38]. Estos elementos tienden a ser fieles marcadores filogenéticos y a estar bien conservados en primates. El estudio evidenció la presencia de 1 grupo de genes *MHC-E*, otro de *MHC-F*, 2 grupos de genes *MHC-G-like* y 4 grupos de genes *MHC-B-like* en tres especies de platirrininos [38].

En resumen, la evidencia actual muestra que los monos del Nuevo Mundo expresan principalmente loci clásicos del *MHC-I* relacionados con *MHC-G-like* y no-clásicos homólogos a *MHC-E* y *-F*. Así mismo, existe evidencia sólida que indica que este grupo de primates tienen loci relacionados a *MHC-B*, aunque se desconoce su número, diversidad entre especies y niveles de polimorfismo.

# IV. METODOLOGÍA

## ***1. Análisis genómico del MHC-I.***

De bases de datos públicas se obtuvieron secuencias de BACs (Bacterial Artificial Chromosome) para los primates del Nuevo Mundo *Ateles geoffroyii* y *Callicebus Moloch* generados por el NIH Intramural Sequencing Center (NISC) y de proyectos de genoma para las especies *Callithrix jacchus* y *Saimiri boliviensis* depositadas en el GenBank. La predicción de genes se realizó empleando los programas GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) y AUGUSTUS (<http://augustus.gobics.de/>) para identificar modelos de genes que luego se compararon con bases de datos públicas mediante BLAST. Adicionalmente se realizó un análisis de secuencias repetitivas y retroelementos de las regiones flanqueadas de los genes de MHC-I en estas mismas especies, usando el programa REPEATMASKER (<http://repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>) que usa modelos de HMM. Las regiones genómicas fueron alineadas con el programa MAUVE y comparadas con las regiones homólogas de humanos.

## ***2. Obtención de muestras***

Se obtuvieron muestras de sangre periférica (0.5-1ml) de 1 individuo de cada una de las especies *Saimiri sciureus* (mono ardilla), *Saguinus oedipus* (tití cabeciblanco), *Saguinus leucopus* (tití gris), *Alouatta seniculus* (mono aullador), *Ateles belzebuth* (mono araña), *Ateles hybridus* (marimonda), *Cebus albifrons* (maicero), *Cebus apela* (maicero cachón), *Cebus capuchinus* (maicero cariblanco) y *Lagothrix lagothericha* (churuco). Los animales se mantuvieron en varios centros de rescate y rehabilitación de fauna silvestre: URRAS (Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Corporación Autónoma Regional de Norte de Santander (Corponor) y Corporación Autónoma Regional del Alto Magdalena (CAM) de Neiva. Para la especie *C. albifrons* se muestrearon 12 individuos más que provienen de los dos últimos centros. Los animales fueron manipulados por personal calificado de cada uno de los centros, siguiendo protocolos establecidos y aceptados internacionalmente. Las muestras se conservaron en TRIZol (Invitrogen) directamente de las unidades de rescate para ser procesadas luego en el laboratorio.

### **3. Extracción de RNA y RT-PCR**

De las muestras obtenidas se realizó extracción de RNA total con el reactivo de TRIzol, siguiendo los protocolos y recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Para realizar síntesis de cDNA con Transcriptasa Reversa (RT) se empleó el kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit de Fermentas. Con base en secuencias genómicas, se diseñaron primers degenerados para amplificar la mayor cantidad de genes de MHC-I incluyendo *MHC-G-like* y *MHC-B*. El primer forward empleado fue 5'TAACGGTCMTGGMGCCCCGAA3' y el primer reverse fue 5'AATGAGAGACACATCAGAGCC 3', lo cuales hibridizan en los exones 1 y 8, respectivamente. El procedimiento de PCR se llevó a cabo por 5 minutos de denaturación a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 55 seg a 62,6°C y 65 segs de a 72°C. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1%, y los productos de amplificación se purificaron del gel con el kit Invitrogen PureLink. Posteriormente, estos productos se ligaron al vector pGEM T Easy Vector (Promega) que se usó para transformar células químicamente competentes JM109 (Promega). Los clones escogidos se secuenciaron por método Sanger en ambas direcciones, empleando un primer Forward (T7) y uno Reverse (SP6) del vector pGEM. Debido al alto grado de polimorfismo de los genes de *MHC-I*, se secuenciaron un mínimo de 24 clones por individuo, reportando cada secuencia que tenga al menos 3 clones idénticos.

### **4. Análisis Evolutivo y filogenético**

Los análisis evolutivos se realizaron con diferentes grupos de datos: retroelementos, genes, intrones, exones 2-3 y exones 4-8. Las secuencias obtenidas se alinearon con el algoritmo MUSCLE [39] editándose manualmente en el programa MEGA 5.2 [40] . Los retroelementos se obtuvieron de las regiones flanqueantes de los genes *MHC-I* con 5.000 bp corriente arriba. Los análisis con los genes completos incluyeron las secuencias de exones e intrones. Para la reconstrucción filogenética, se identificó el modelo de sustitución más apropiado con jModelTest [41] y se emplearon diferentes algoritmos incluyendo: Neighbor-Joining (NJ) [42] implementado en MEGA5.2, Maximum Likelihood (ML) (MEGA 5.2), Análisis Bayesiano [43] implementado en MrBayes.

## ***5. Evaluación de selección natural y otros mecanismos evolutivos.***

Los análisis de selección natural se llevaron a cabo por tres aproximaciones. En la primera se evaluó la razón promedio entre el número de sustituciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) con el programa PARRIS [39], en tres regiones del gen por separado a) los codones de los exones 2 y 3 que codifican residuos interactuantes con el péptido, b) los codones restantes de los exones 2 y 3 (NO-PBR) y los exones 4-8. En la segunda aproximación se usó el programa “Evolutionary Fingerprinting” (EVF) que clasifica todos los codones de las secuencias en categorías o clases de acuerdo al valor de la razón dN/dS [44]. En la tercera aproximación se realizó un análisis de selección por codones usando los algoritmos SLAC, FEL, REL, FUBAR y MEME implementados en el servidor Datamonkey ([www.datamonkey.org](http://www.datamonkey.org)). Posiciones bajo selección positiva se consideraban si se detectaba la misma posición con al menos dos de estos algoritmos. Finalmente, eventos de recombinación y/o conversión génica se evaluaron mediante el programa GENECONV de la suite RDP4 [45] empleando 1000 permutaciones, y aceptando las recombinaciones con un valor p menor a 0,05%.

## ***6. Predicción de péptidos.***

Para la predicción de péptidos que se unen al MHC-I se empleó el programa NetMHCpan V3.0 y MHCcluster (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) del Instituto de Bioinformática de Dinamarca. Se realizó de manera local, empleando un set de 50,000 péptidos obtenidos de la base datos IEDB (Immune epitope database [www.iedb.org](http://www.iedb.org)). Los 5,000 péptidos que mejor predicción de unión tenían se representaron con Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>). En algunos casos la predicción tiene una probabilidad menor de 50%, aunque fueron aceptados para poder ilustrar las diferencias.

## ***7. Predicción de interacción MHC- KIR.***

Para predecir una posible interacción entre pares MHC-KIR se realizaron modelos 3D de las secuencias disponibles de MHC-I y KIR de platirrinos incluyendo las que se están reportando. El modelamiento se realizó en el servidor SWISS-MODEL [46] mediante homología, ya que la similaridad entre las secuencias no es menor que el 70%. La plantilla que se empleó fue el modelo de cristalografía HLA-B57 unido a KIR3DL1 (PDB: 3VH8). Con los modelos se realizó un alineamiento de las estructuras y se predijo la cantidad de puentes de hidrógeno para cada par MHC-I:KIR mediante el programa Pymol( [www.pymol.sourceforge.net](http://www.pymol.sourceforge.net) ). Adicionalmente se realizó un análisis de energías

libres de desolvatación de los pares MHC-KIR con el programa FASTCONTACT ( <http://structure.pitt.edu/servers/fastcontact> ). Las parejas con la menor energía libre de desolvatación y el mayor número de puentes de hidrógeno, se consideraron potenciales interactores. Para esto se propuso un índice de interacción  $I = kh / \ln dG$  donde k representa el promedio de energía de un puente de hidrógeno, h el número de puentes de hidrógeno, y dG la energía libre de desolvatación. Este índice se validó con trabajos experimentales de interacción MHC-KIR en humanos y otros primates del Viejo Mundo. Luego se evaluó la posibilidad de detección de falsos positivos y falsos negativos, con base en la información experimental.

# V. RESULTADOS

## 1. *Evolución genómica del MHC clase I en Primates del Nuevo Mundo.*

---

Las secuencias genómicas de MHC-I han ayudado a dilucidar las relaciones evolutivas de estos genes en grupos animales como los primates. Actualmente se conocen secuencias genómicas para Humanos, chimpancés, gorilas, macacos y lemures. En Primates del Nuevo Mundo la única descripción genómica de MHC-I reportada hasta ahora es la del bloque beta de *Callithrix jacchus*[3]. Aún se desconoce la organización del bloque alfa donde se esperaría encontrar los genes *MHC-G-like*. No obstante, se han realizado proyectos de secuenciación del genoma para varias especies de primates del Nuevo Mundo, por lo cual fue posible encontrar secuencias genómicas de los bloques alfa y beta del MHC-I en las bases de datos públicas.

### ***1.1 Los Primates del Nuevo Mundo poseen regiones homólogas a los bloques alfa y beta del MHC-I humano.***

De la base de datos Genbank, se descargaron todas las secuencias de *scaffolds* de secuenciación por métodos de última generación y de todos los BACs (Bacterial Artificial Chromosome) de las especies *Saimiri boliviensis* (*Sabo*), *Callithrix jacchus* (*Caja*), *Callicebus moloch* (*Camo*) y *Ateles geoffroyii* (*Atge*). La búsqueda de secuencias con información de MHC-I, se realizó empleando del algoritmo BLAST, tomando como “query” secuencias completas de MHC-I, previamente descritas en la especie o en especies cercanas, y como “subject” todos los *scaffolds* y BACs de una especie. De esta manera, se identificaron 2 secuencias BAC para cada una de las especies *Ateles geoffroyii* y *Callicebus moloch*, 6 secuencias BAC para la especie *Callithrix jacchus* y 6 *scaffolds* para *Saimiri boliviensis* con secuencias similares a MHC-I.

Los BACs identificados en *C. jacchus* y *C. moloch* contienen secuencias continuas, sin gaps en medio de su secuencia, mientras que los de *A. geoffroyii* tienen fragmentos secuenciados separados por gaps de distancia desconocida. Los scaffolds de *S. boliviensis* fueron generados con secuenciación de nueva generación y contienen numerosos gaps internos tanto de distancia conocida como desconocida (Ver Anexo 1).

La Figura 7 representa los alineamientos de las regiones genómicas obtenidas. En *C. moloch*, los dos 2 BACs (gi: 315630381 y 302565857) se alinean entre sí, en una región de aproximadamente 120 kb con similaridad del 99,9%, resultando en un contig de 240 kb sin gaps internos. Los 2 BACs de *A. geoffroyii* (gi: 296923892, 301173414) se alinean en una región de cerca de 157 kb con 99% de similaridad, generando un contig de aproximadamente 277 kb con 3 gaps internos de distancia desconocida (Figura 7A). Con los 6 BACs de la especie *C. jacchus* se pueden obtener dos contigs. En uno de ellos se ensamblan los BACs NW\_003188308.1, NW\_003185658.1, NW\_003185656.1, y NW\_003185734.1, formando un contig de 106 kb, y con los otros dos BACs (NW\_003188569.1 y NW\_003187949.1) se obtiene un contig de aproximadamente 20 Kb. Los 2 BACs de esta especie descritos por Shiina et al [3] (AB600201.1 y AB600202.1) se muestran en la Figura 7B. Con los scaffolds de *S. boliviensis* (NW\_003943887.1, NW\_003943863.1, NW\_003943876.1, NW\_003943840.1, NW\_003943835.1) se obtiene un contig entre los dos primeros scaffolds compartiendo una región de 35 kb con 92% de similaridad y otro contig entre el tercer y el cuarto scaffold, compartiendo una región de 20Kb y una similaridad del 90%. Los scaffolds NW\_003943835.1 y NW\_003943627.1 no se alinean entre si (Figura 7B).

La predicción y anotación de los genes de las secuencias genómicas se realizó con el programa GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) y se confirmaron con BLAST (Anexo 1). Entre los genes anotados, además de genes MHC-I, existen otros genes y pseudogenes con los cuales es posible asignar regiones homólogas entre especies. Generalmente esos genes están ubicados en los extremos centromérico y telomérico de los bloques genómicos del MHC-I y corresponden a los genes marco (Anexo 2). Además de los genes marco, se encontraron varios pseudogenes como HCG4/8 compartidos



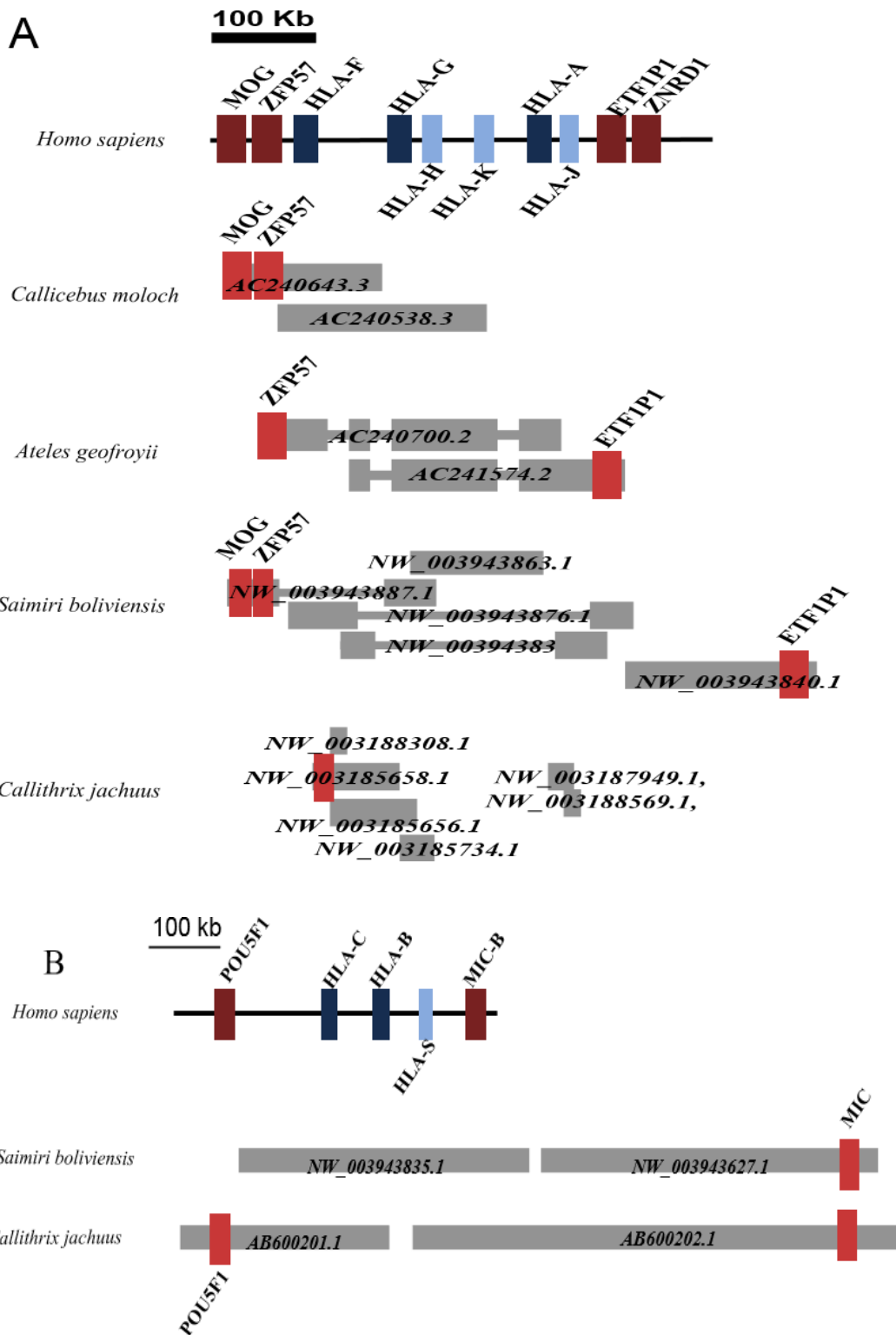


Figura 7. Ubicación aproximada de los BACs y scaffolds encontrados en la búsqueda de secuencias genómicas de MHC-I en platirrinos. Las secuencias genómicas de patirrinos se comparan con sus regiones homólogas de humano. Para cada especie se muestra los BACs o scaffolds con su identificador. Las líneas más gruesas representan secuencias continuas, mientras que las líneas más delgadas son gaps separando secuencias. Los rectángulos rojos sobre las secuencias genómicas denotan los genes marco A) BACs o scaffolds con secuencias similares a *MHC-G-like*. B) BACs o scaffolds con secuencias similares a *MHC-B*.

con humanos, o DHFRL1, SH3KBP1, HSP90P y MCCD1P ausentes en humanos (Anexo 2). No obstante, ninguno de los pseudogenes del bloque beta de humanos fue identificado en platirrinos, aunque los pseudogenes previamente anotados en la región genómica de *C. jacchus* por Shiina et al [3], como RNF34, RNF181 CCNE1, CCNG1, también se encontraron en *S. boliviensis* (Anexo 2).

En resumen, se encontraron secuencias genómicas homologas al bloque alfa de MHC-I en *C. moloch*, *A. geoffroyii*, *C. jacchus* y *S. boliviensis*, mientras que secuencias homólogas al bloque beta de MHC-I solo se encontraron en *S. boliviensis* (además de las ya descritas en *C. jacchus*).

## **1.2. Los genes del MHC-I identificados en las secuencias genómicas son similares a MHC-F, MHC-G-like y MHC-B.**

En la anotación de las regiones genómicas se encontraron al menos 5 genes MHC-I en cada una de las especies (Tabla 2 y Anexo 1). Con el fin de definir las relaciones evolutivas entre los genes encontrados en la comparación genómica y aquellos previamente descritos en primates, se realizó un análisis filogenético basado en secuencias intrónicas y con el gen completo (Figura 8 y Anexo 3).

De los 5 genes de MHC-I encontrados en *C. moloch* (Camo), 1 está relacionado con *MHC-F* y 4 con *MHC-G-like* (de los cuales uno es un pseudogen). De los 5 genes encontrados en *A. geoffroyii* (Atge), 2 son similares a *MHC-F* y 3 a *MHC-G-like*, todos putativamente expresados. En *C. jacchus* (Caja) se encontraron 10 genes, 3 pertenecientes al grupo de *MHC-F* (uno de los cuales es probablemente un pseudogen) y 7 genes están relacionados a *MHC-G-like*, aunque solo uno de ellos es putativamente expresado. En *S. boliviensis* (Sabo) se encontraron 2 genes similares a *MHC-F*, 9 similares a *MHC-G-like* (4 de ellos tienen codones de parada prematuros) y 15 similares *MHC-B*, incluyendo 2 pseudogenes. Es importante resaltar que en el scaffold 232 (NW\_003943835.1) de *S. boliviensis*, que tiene regiones homologas a *MHC-B*, se encontraron genes similares a *MHC-G-like* y *-F*, ubicados en regiones separadas con gaps (la región comprendida entre 370kb – 498kb) de distancia desconocida.

**Tabla 2.** Descripción de genes MHC-I en de secuencias genómicas de Primates del Nuevo Mundo.

Especie	BAC-ID	Gen MHC	Nomenclatura	Exones/intrones														Características u observaciones	
				1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7		8
Saimiri boliviensis (Sabo)	NW_003943627.1 Scaffold 24	MHC1	Sabo-B1					X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica		
		MHC2	Sabo-B2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Inserción en el exón 3 1000bp.
		MHC3	Sabo-B3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	
		MHC4	Sabo-B4	X	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	
		MHC5	Sabo-B5	X	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	
		MHC6	Sabo-B6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Codon de parada exon 5
	NW_003943835.1 scaffold00232	MHC7	Sabo-B7		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	
		MHC8	Sabo G3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada (X2) en exón 2 y X1 en exon 3.
		MHC9	Sabo G4					X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica		
		MHC10	Sabo F01					P	X	X	X	X	P				Codifica	Parece ser un F, tiene deleción en el intrón 3 típica de los F	
		MHC11	Sabo-B8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	
		MHC12	Sabo-B9					X	X	X	X	P					Codifica		
		MHC13	Sabo-B10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	
		MHC14	Sabo-B11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	
		MHC15	Sabo-B12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	Inserción de 1000bp en intrón 2. Insercion 3bp exon 3
		MHC16	Sabo-B13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	Insercion 12 bp en Exon 1
	MHC17	Sabo-B14					X	X		X	X	X				Codifica			
	MHC18	Sabo-B15					P	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
NW003943887.1 scaffold00284	MHC19	Sabo G1 01					P	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
NW003943863.1 scaffold00260	MHC20	Sabo G1	X	P			P	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
	MHC21	Sabo G2			P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
NW003943876.1 scaffold00273	MHC22	Sabo G8					P	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
	MHC23	Sabo F02	X	X	X	X	P									Codifica	Inserción 6bp y deleción 9bp en exon 2		
NW003943840.1 scaffold00237	MHC24	Sabo G5		P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada en exón 1. Deleción de 27-29 bp exo		
	MHC25	Sabo G6					P	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!			
	MHC26	Sabo G7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
Callithrix jacchus (Caja)	NW003185658.1	MHC1	Caja F01	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	Inserción 6bp en exon 2 y deleción 9bp en exon 2	
		MHC2	Caja G101	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada en exón 3.	
		MHC3	Caja G2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica		
	NW003188308.1	MHC4	Caja F02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	Inserción 6bp y deleción 9bp en exon 2	
		MHC5	CajaG301					P	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada en exón 4.	
		MHC6	Caja G102	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	Pseudogen. Codon de parada en exón 3.	
		MHC7	CajaG6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Inserción 6bp en exon 2. Codon de parada exón3	
		MHC8	Caja F03	X	X	X	X	X					P	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada en exón 3	
NW003185734.1	MHC9	Caja G3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada en exón 1 y 4.			
NW003187949.1	MHC10	Caja G4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada en exón 1. Deleción de 27-29 bp exo			
NW003188569.1	MHC11	CajaG5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada en exón 1.			
Ateles geoffroyi (Atge)		MHC1	AtgeG1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
		MHC2	AtgeF1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	Inserción 6bp y deleción 9bp en exon 2		
		MHC3	AtgeF2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	Inserción 6bp en exon 2		
		MHC4	AtgeG2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
		MHC5	AtgeG3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
Callicebus moloch (Camo)		MHC1	CamoF	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica	Inserción 6bp y deleción 9bp en exon 2		
		MHC2	CamoG1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
		MHC3	CamoG2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Pseudogen!	Pseudogen. Codon de parada en exón 1. Deleción de 27-29 bp exo		
		MHC4	CamoG3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			
		MHC5	CamoG4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Codifica			

Una X, indica que el exon o intron está presente en la secuencia. P indica una secuencia parcial. En la columna Gen, se indica el gen como se encuentra en la anotación genómica (Anexo 1) en la columna Nomenclatura, se encuentra el nombre empleado para cada gen identificado.

Probablemente este *scaffold* está mal ensamblado y estas secuencias realmente pertenecen al bloque alfa. En ninguna de las secuencias genómicas estudiadas se encontraron genes relacionados a *MHC-A*, -*E* o -*C* o a los pseudogenes de humano.

### **1.2.1 Genes relacionados a *MHC-F***

En todas las especies estudiadas se encontraron secuencias estrechamente relacionadas a *MHC-F* de *Catarrhini* (humanos y macacaco Rhesus - *HLA-F* y *MAMU-F*) distribuidas en dos grupos: uno que contiene genes de las especies *C. jacchus*, *C. moloch*, *Aotus trivirgatus* (bases de datos) y *A. geoffroyii*, y otro donde se incluyen secuencias de *S. boliviensis* y *A. geoffroyii*, aunque en este último grupo, las relaciones no están claramente resueltas (Figura 8). La filogenia refleja también una duplicación de *MHC-F* en las especies *A. geoffroyii* y *C. jacchus*, aunque en esta última especie una de las copias es un pseudogen. Aunque en *S. boliviensis* hay dos secuencias relacionadas con *MHC-F*, estas parecen ser alelos de un mismo locus. Adicionalmente, las secuencias del primer grupo de *MHC-F* (excepto *CajaF03*) poseen una delección de 9 bp en el exon 2, mientras que las secuencias del segundo grupo y *CajaF\_03* no poseen dicha delección. Esto sugiere que *MHC-F* se duplicó en el ancestro de los platirrininos.

### **1.2.2. Genes relacionados a *MHC-G-like***

En el genoma de los platirrininos existen múltiples copias de *MHC-G-like* formando un gran clado hermano de los genes *MHC-G/MHC-J* de catarrinos (Figura 8). Sin embargo, no puede afirmarse que existan relaciones de ortología entre *MHC-G* de catarrinos y *MHC-G-like* de platirrininos.

La filogenia de la Figura 8 muestra que los genes *MHC-G-like* se distribuyen en 4 grupos: El Grupo G-I incluye únicamente pseudogenes (Tabla 2) de *C. moloch* (familia *Pitheciidae*), y de especies de los géneros *Saimiri*, *Callithrix* y *Saguinus* (familia *Cebidae*). El grupo G-II reúne sólo 3 secuencias de especies de la familia *Cebidae*: dos probables alelos (98% de identidad) de un pseudogen de *C. jacchus* y la secuencia *Sabo G8* de *S. boliviensis*. En el grupo G-III están representadas las familias *Atelidae* (*Atge-G2* de *A. Geoffroyii*) y la familia *Cebidae* con secuencias de *Aotus trivirgatus* y *S. boliviensis*. Finalmente, el grupo G-IV es el más numeroso y tiene secuencias de todas las especies estudiadas. Así, los genes *MHC-G-like* de platirrininos muestran una extensa y continua duplicación génica asociada a

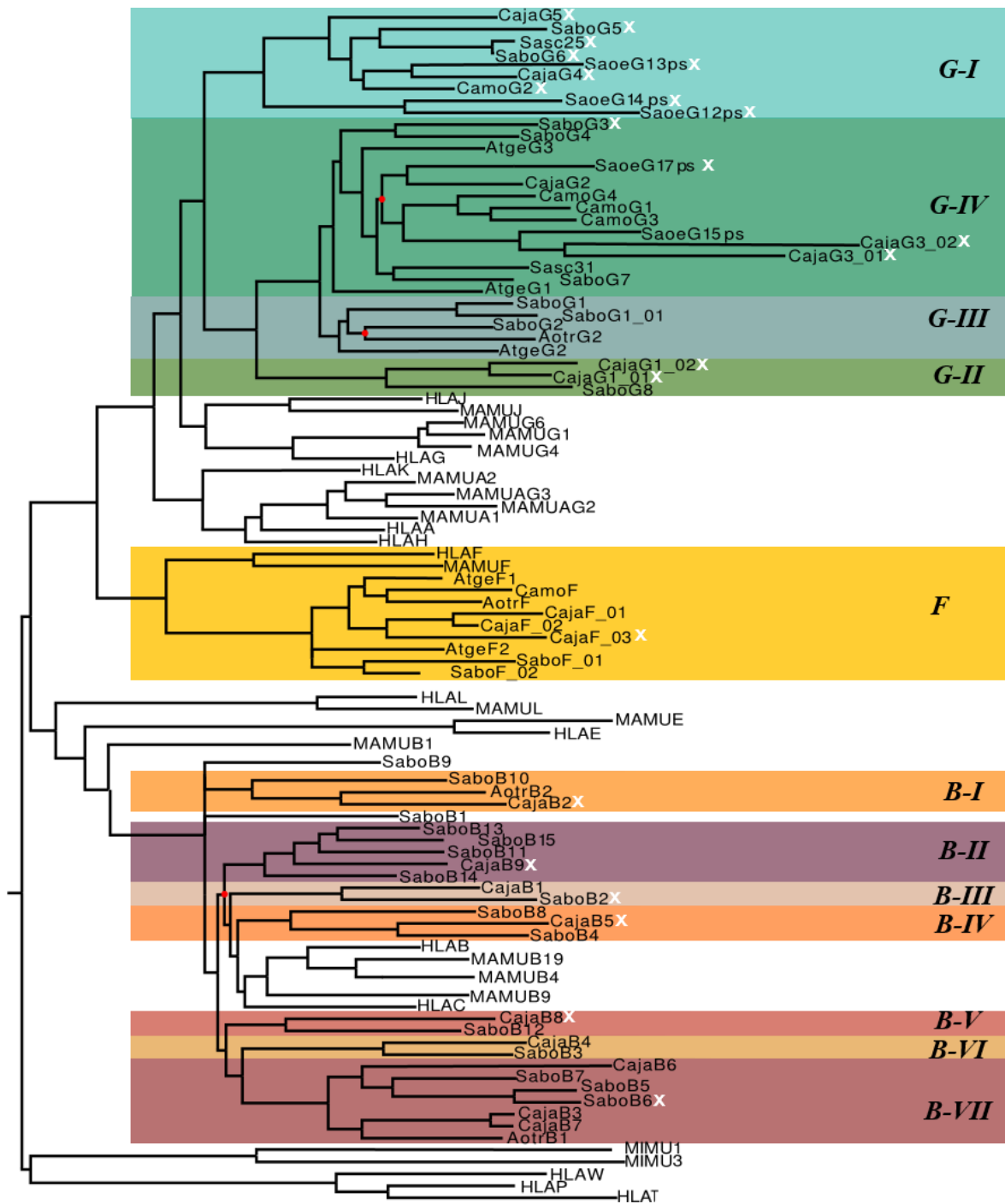


Figura 8. Filogenia de genes encontrados en regiones las regiones genómicas del MHC-I de plattirrhinos. La topología que se muestra es del análisis Bayesiano, basándose en los intrones de los genes. El árbol está enraizado con secuencias MHC-I de Lemures y pseudogenes. Todas las ramas tienen soporte estadístico mayor a 80% de probabilidad posterior (pp), excepto aquellos nodos resaltados en rojo. Las franjas indican linajes de genes: en color azul y verde, linajes de *MHC-G-like*, en amarillo el linaje de *MHC-F* y, en rojo y naranja linajes de *MHC-B-like*.

procesos de pseudogenización. Aunque la tasa de duplicaciones varía entre especies de platirrininos, es ciertamente mucho mayor a la observada en la región homóloga de humanos, lo cual sugiere que este grupo de genes se ha duplicado de forma extensa desde su divergencia con los genes de Catarrhini, manteniendo en muchos casos los linajes más recientes y pseudogenizando aquellos ancestrales.

### **1.2.3. Genes relacionados a MHC-B o MHC-B-like**

La información genómica del bloque beta del MHC-I de platirrininos solo se encontró en *Callithrix jacchus* y *Saimiri boliviensis*, ambas pertenecientes a la familia *Cebidae*. Para la especie *Aotus trivirgatus* sólo se dispone de dos secuencias genómicas *Aotr B1* y *Aotr B2*. A diferencia de los genes *MHC-G-like*, las secuencias de *MHC-B* están claramente relacionadas con los loci *MHC-B* y *-C* de catarrinos, pues estas se agrupan como clado hermano de uno de los grupos de secuencias de platirrininos (Figura 8).

La distribución filogenética de los genes *MHC-B* de platirrininos muestra 7 grupos: El grupo B-I está presente en todas las especies de la familia *Cebidae*, agrupando posibles ortólogos de tres especies (*S. boliviensis*, *A. trivirgatus* y *C. jacchus*) e incluyendo duplicaciones únicas en *S. boliviensis*. El grupo B-II contiene 4 genes de *S. boliviensis* y un pseudogen de *C. jacchus*. Los grupos B-III, B-IV, B-V y B-VI contienen genes ortólogos entre *S. boliviensis* y *C. jacchus*, donde a excepción del grupo B-VI, la secuencia de alguna de las dos especies es un pseudogen. Este patrón ilustra claramente un proceso de expansión y contracción génica diferencial. Finalmente, el grupo B-VII contiene 3 genes de *S. boliviensis* y de *C. jacchus* y uno de *A. trivirgatus*. Estos datos indican que tanto los genes *MHC-G-like* como los *MHC-B* de platirrininos han evolucionado por un continuo proceso de duplicación y pérdida (o pseudogenización) de genes, consistente con un modelo de acelerado de nacimiento y muerte de genes [34].

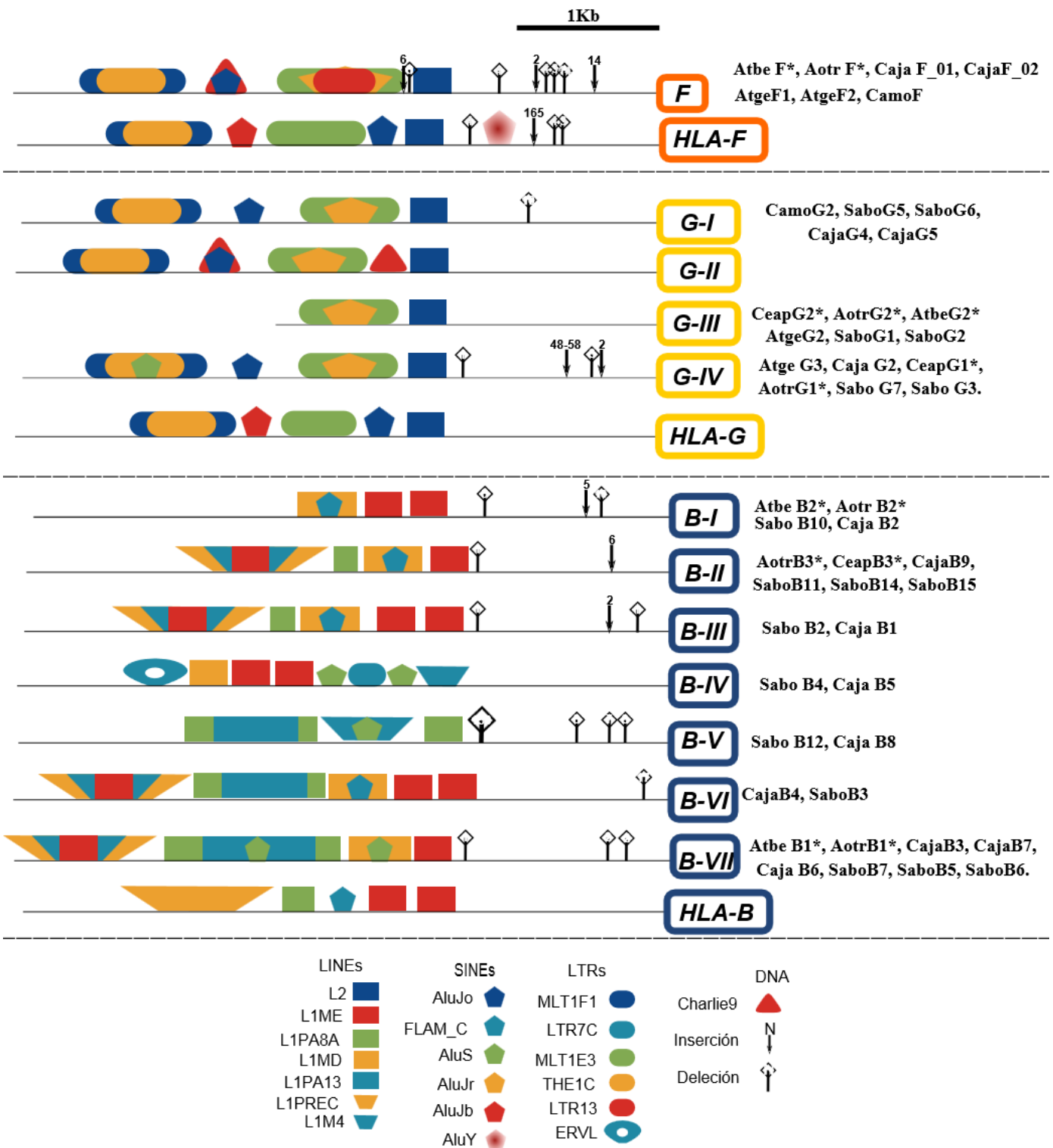
### **1.3. Los diferentes linajes de MHC-F, MHC-G-like y MHC-B-like se identifican también con retroelementos ubicados en la región 5'.**

La presencia y el orden de retroelementos en la región 5' de los genes MHC-I es un buen indicador de

relaciones evolutivas[38]. Vale la pena aclarar que la distancia de 5Kbp no es aleatoria, se debe en parte a que esta región del MHC-I está densamente poblada de genes, lo cual dificulta el análisis con secuencias más grandes. La búsqueda de retroelementos en genes del MHC-I de platirrininos mostró la presencia de una variedad de LINEs (Long Interspersed Nuclear Element), SINEs (Short Interspersed Nuclear Element), transposones de DNA y LTRs (Long Terminal Repeats). La presencia de estos retroelementos permite identificar 2 grandes grupos de genes: el primero incluye *MHC-F* y *-G-like* y están definidos por un LINE tipo L2 y un SINE tipo AluJo, y el segundo incluye genes *MHC-B* y se define por un LINE tipo L1 y en algunos casos un SINE tipo FLAM\_C o Alu\_S.

La Figura 9 muestra la organización de los retroelementos de los genes MHC-I de platirrininos. Los genes *MHC-G-like* (indicados en amarillo) se diferencian del *MHC-G* humano por poseer un retroelemento AluJr y no presentar retroelementos del tipo AluJb. Dentro de los genes *MHC-G-like* se pueden distinguir 4 grupos similares a los observados en la filogenia de la Figura 8: El primer grupo perteneciente al linaje G-I de la filogenia, tiene una delección de 10 bp típica en la región 5' UTR y el siguiente orden de retroelementos: L2-MLT1-AluJ-MLT1-AluJo-MLT1F1-THE1C-MLT1F1. El segundo grupo coincide con el linaje G-II de la filogenia, y posee transposones de DNA tipo Charlie 9. El tercer grupo reportado previamente como NWM-G2 [38], corresponde al linaje G-III de la filogenia y no tiene retroelementos típicos que lo identifique. El cuarto grupo, también reportado anteriormente (NWM-G1) [38], corresponde al linaje G-IV y posee una inserción de repeticiones del nucleótido T con longitudes entre 48 - 58 bp, y un retroelemento AluS.

*HLA-B* y los *MHC-B* de platirrininos tienen en común la presencia de retroelementos tipo L1. Sin embargo, estos se diferencian porque los genes de platirrininos tienen delecciones típicas y retroelementos del tipo L1MD (excepto en los linajes B-IV y B-V). Así mismo, los *MHC-B* de platirrininos se dividen en 7 grupos que también coinciden con la filogenia de la Figura 8. Un primer grupo que contiene representantes del linaje B-I (anteriormente NWM-B2 [38]), y se caracteriza por tener dos delecciones de 10 y 3 bp y una inserción de 5 bp en la región 5'UTR , y los siguientes retroelementos: L1ME-L1ME-L1MD-FLAM\_C-L1MD (Figura 9). El segundo grupo incluye las secuencias *AotrB3* y *CeapB3* (del grupo NWM-B3 de Sawaii et al [38]), y se caracteriza por la ausencia de un L1ME y la



**Figura 9. Retroelementos flanqueantes en ubicación 5' de los genes MHC-I de platirrininos.** Los retroelementos fueron obtenidos mediante el programa RepeatMasker con la base de datos Dfam y HMM incluidos en el programa. Cada retroelemento está representado por una figura en su posición aproximada. Genes Naranja, *MHC-F*; amarillo, *MHC-G* y Azul, *MHC-B*. Las secuencias marcadas con un asterisco, son las previamente publicadas por Sawaii et al 2004 [31]. Los linajes correspondientes a la filogenia de la Figura 8 se indican a la derecha.



presencia de retroelementos L1PA8A, L1PREC y L1M4. El linaje B-III es un híbrido con una región 5' similar al grupo B-II y una región 3' similar a B-I. El linaje B-IV tiene los retroelementos L1M4, AluS, ERVL y LTR7C. El linaje B-V se caracteriza por una delección de 150 bp en la región 5'UTR y la ausencia de retroelementos L1ME. Los retroelementos del linaje B-VI son semejantes a aquellos de B-III pero con una inserción de los retroelementos L1PA8A-L1PA13-L1PA8A entre los extremos 5' y 3'. El último grupo, B-VII reportado previamente como NWP-B1 por Sawaii et al [38], se caracteriza por la ausencia de FLAM\_C. En este estudio no se encontraron representantes del grupo NWM-B4 descrito por Sawaii et al [38], el cual tiene como único representante a la secuencia *Ceap-B4*.

**Tabla 3.** Linajes ortólogos de MHC-I en *Platyrrhini*

Linaje ortólogo	Especie	Gen	Evidencia
G-I	<i>C. moloch</i>	Camo-G2	I+R
	<i>C. jacchus</i>	Caja-G4	I+R
	<i>S. oedipus</i>	Saoe G-13	I
	<i>S. boliviensis</i>	Sabo G-6	I+R
	<i>S. boliviensis</i>	Sabo G-5	I+R
	<i>S. sciureus</i>	Sasc-25	I
G-II	<i>S. boliviensis</i>	Sabo-G8	I+R
	<i>C. jacchus</i>	Caja-G1	I+R
G-III	<i>A. geoffroyii</i>	Atge-G2	I+R
	<i>C. apella</i>	Ceap-G2	R
	<i>A. trivirgatus</i>	Aotr-G2	I+R
	<i>A. belzebuth</i>	Atbe-G2	R
B-I	<i>C. jacchus</i>	Caja-B2	I+R
	<i>A. trivirgatus</i>	Aotr-B2	I+R
	<i>A. belzebuth</i>	Atbe-B2	R
	<i>S. boliviensis</i>	Sabo-B10	I+R
B-II	<i>S. boliviensis</i>	Sabo-B11	I+R
	<i>A. trivirgatus</i>	Aotr-B3	R
	<i>C. apella</i>	Ceap-B3	R
	<i>C. jacchus</i>	Caja-B9	I+R
B-III	<i>C. jacchus</i>	Caja-B1	I+R
	<i>S. boliviensis</i>	Sabo-B2	I+R
B-IV	<i>C. jacchus</i>	Caja-B5	I+R
	<i>S. boliviensis</i>	Sabo-B4	I+R
B-V	<i>C. jacchus</i>	Caja-B8	I+R
	<i>S. boliviensis</i>	Sabo-B12	I+R
B-VI	<i>C. jacchus</i>	Caja-B4	I+R
	<i>S. boliviensis</i>	Sabo-B3	I+R

Evidencia de Intrones (I) o retroelementos(R) para postular cada gen a un linaje ortólogo.

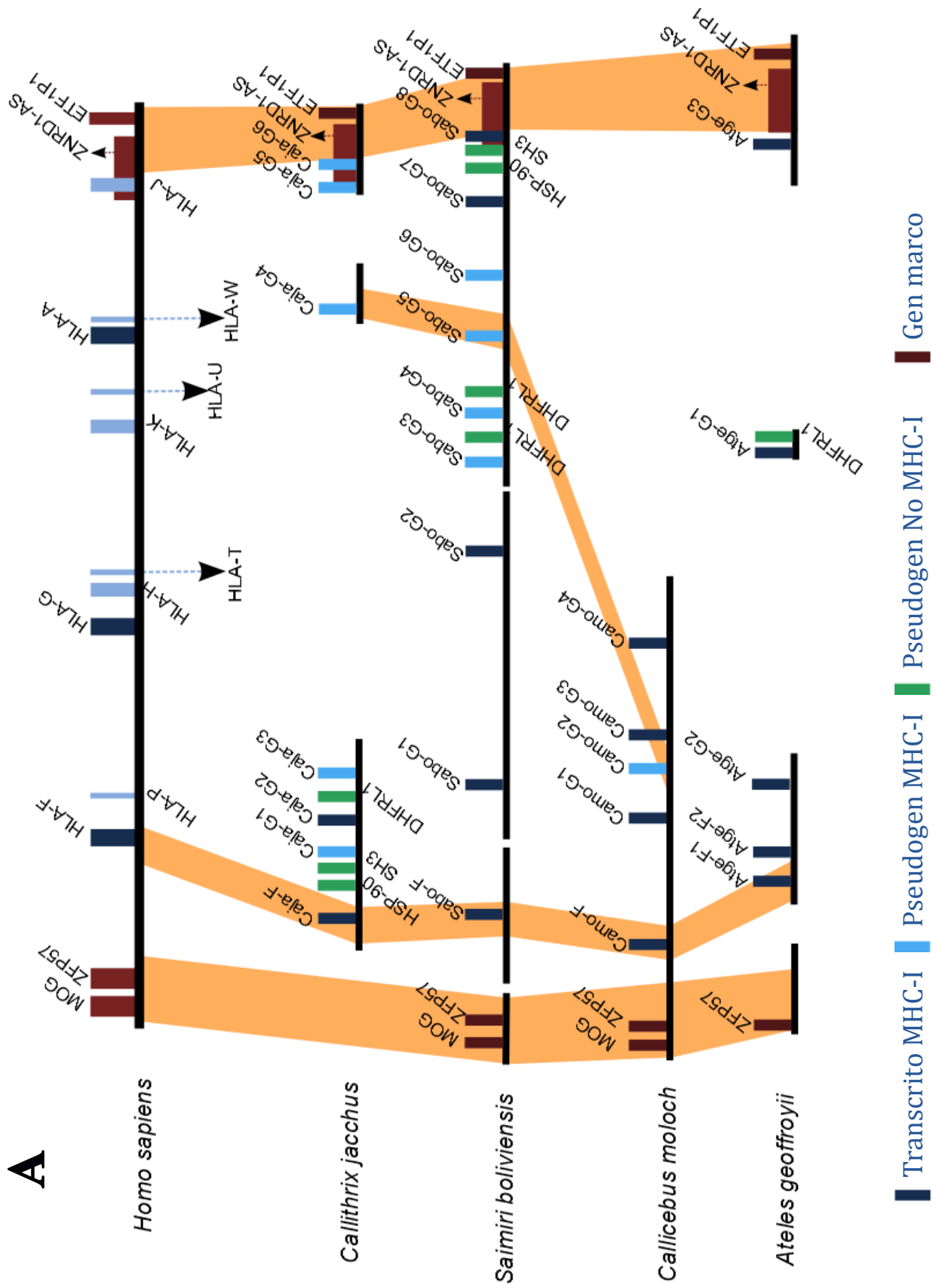
Este análisis soporta las relaciones entre los grupos de genes descritos en la filogenia de la Figura 8, ampliando además el espectro de especies que pueden estar incluidas en dichos grupos. Por ejemplo, el grupo G-III de *MHC-G-like*, incluye además genes de las especies *C. apella* y *A. belzebuth*, el linaje G-IV incluye ahora secuencias de *C. apella* y *A. trivirgatus*, o el linaje B II ahora incluye secuencias de *A. trivirgatus* y *C. apella*. La información derivada de la filogenia de intrones y el análisis de retroelementos presentes en las regiones 5' de los genes son consistentes y permiten postular grupos de ortología en las diferentes especies (Tabla 3).

#### ***1.4 Sintenia y comparación genómica***

El alineamiento genómico del bloque alfa del MHC-I (genes *MHC-F/G/A*) (Figura 10) muestra conservación de la sintenia definida por los genes marco *MOG* y *ZFP57* en la región telomérica, y por *ETFP1* y *PP1R1* en la región centromérica. Generalmente seguido de los genes marco de la región telomérica se encuentran los genes *MHC-F*, ortólogos entre todas las especies donde se identificó. A excepción de la duplicación del gen *MHC-F*, la región telomérica del bloque alfa conserva la sintenia humanos y platirinos .

Corriente abajo de los genes *MHC-F*, se encuentra un número variable de genes *MHC-G-like* (Figura 10). Los genes *Sabo-G2* y *Atge-G2* del linaje G-III son ortólogos y mantienen la sintenia con los retroelementos flanqueantes. Si bien el gen *Sabo-G1* también pertenece al linaje G-III, la organización de los retroelementos es diferente. El gen marco *DHFRL1* está ubicado hacia la región 3' de algunos genes de *MHC-G-like* como *Atge G1*, *Sabo G3/4* y *Caja G2*, todos ellos pertenecientes al linaje G-IV. Los genes del linaje G-I (*Camo-G2*, *Sabo-G5*, *Caja-G4*) son putativamente ortólogos y es probable que también se encuentre un representante de la especie *A. geoffroyii*. Por último, el genes del linaje G-II también están en sintenia con genes no relacionados a MHC-I, como *SH3 Kinase* y *HSP90*.

El bloque beta de platirinos también conserva la sintenia de humanos, evidenciada por los los genes marco *POU5F* en región telomérica y *FTH/MIC* en la región centromérica. Los genes *MHC-B* circunscritos por estos genes marco, muestran una importante expansión típica de cada especie.



**B**

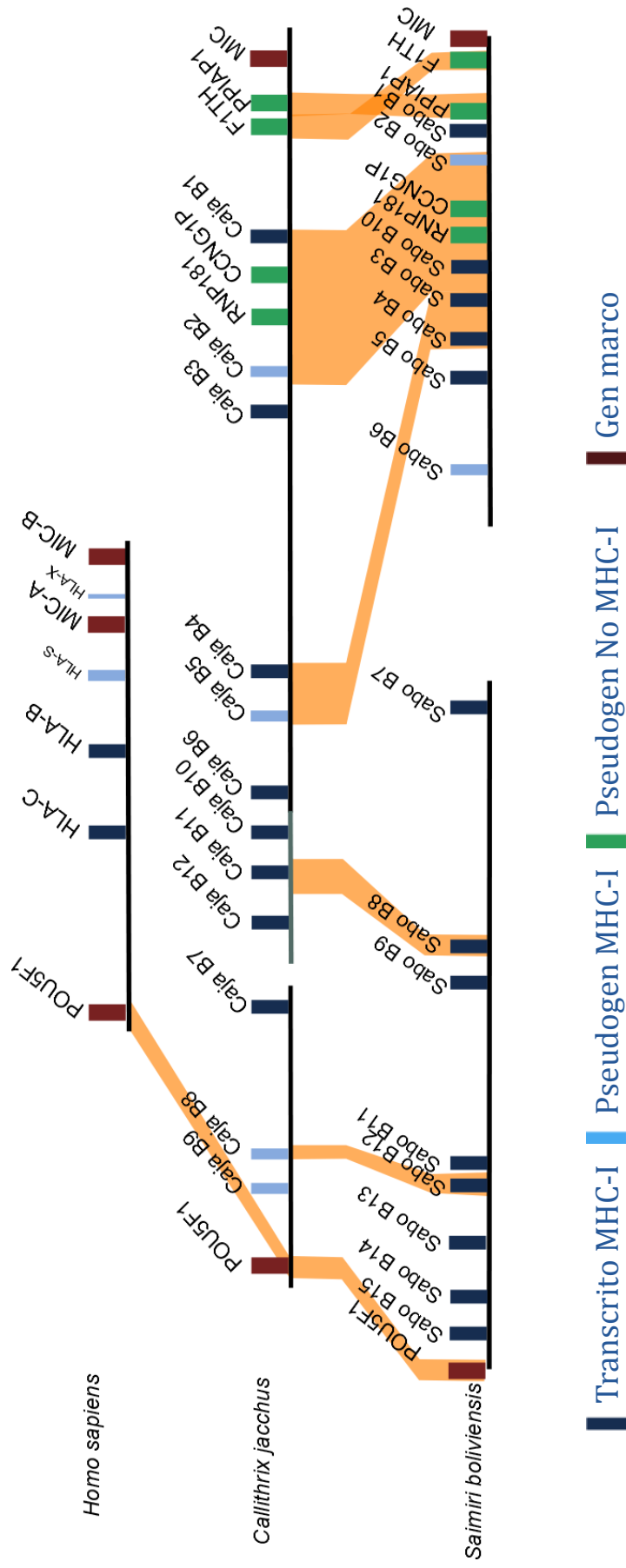


Figura 10. Comparación genómica de las regiones homólogas de MHC-I. A) bloque alfa para las especies *Ateles geoffroyi*, *Callicebus Moloch*, *Callithrix jacchus* y *Saimiri boliviensis*. Las líneas rojas indican duplicaciones. B) bloque beta para las especies *Callithrix jacchus* y *Saimiri boliviensis*. Si dos regiones son ortólogas o similares, se representan con una franja de color.

El alineamiento genómico de la Figura 10 muestra que la única conservación de sintenia hacia la parte centromérica, que se puede evidenciar en esta región entre especies de platirrinos (Figura 10). Otras relaciones de sintenia se observan en genes no pertenecientes al MHC-I, como *CCNG1P* con *Sabo B3* y *Caja B4* o *RNF34* con *Sabo B7* y *Caja B6*.

Hemos descrito y analizado regiones genómicas de MHC-G-Like para cuatro especies y de la región MHC-B para una especie además de la previamente publicada. Esto nos permite concluir que los MHC- I en platirrinos muestran una amplia expansión de los genes *MHC-G-like* y *MHC-B*, así como una duplicación ancestral de los genes *MHC-F*. Las relaciones de ortología permiten deducir que las dinámicas de duplicación parecen ser mucho más acelerada en el bloque alfa que en el beta, ya que de las 4 especies con secuencia del bloque alfa, solo fue posible asignar un caso de ortología. En contraste, en el bloque beta se asignaron relaciones de ortología en 5 parejas de genes *MHC-B* de *C. jacchus* y *S. boliviensis*. Estas dinámicas también se acoplan a un modelo de nacimiento y muerte de genes que dejan loci exclusivos para los Primates del Viejo Mundo como el caso de MHC-A y -C así como un número de loci variable para cada especie de Primates del Nuevo Mundo.