Universidad de la República

Licenciatura en Biología Humana

Informe de Pasantía de Grado

DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES EN UNA MUESTRA DEL HOSPITAL DE RIVERA, URUGUAY

Profa. María Noel Jardi

Tutor y orientador de pasantía: Dr. Arley Camargo

Co-tutores: Dr. Julio Da Luz y Mag. Sara Flores

Lugar de realización: Laboratorio de Biogeografía y Evolución

Centro Universitario de Rivera, Udelar

Noviembre de 2019

TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos **3**

Resumen **4**

Introducción **5**

Hemoglobinopatías *5*

Haplogrupos mitocondriales *7*

Objetivo General **10**

Objetivos Específicos **10**

Objetivos Académicos **11**

Materiales y Métodos **11**

Muestras de sangre y encuesta *11*

Extracción de ADN a partir de sangre entera *12*

Identificación de HbS mediante ARMS-PCR *12*

Identificación de HbS mediante RFLP-PCR *13*

Identificación de α-talasemia delecional *14*

Electroforesis de productos de PCR *14*

Haplogrupos mitocondriales *15*

Resultados **16**

Participantes *16*

Hemoglobinopatías *19*

Haplogrupos mitocondriales *21*

Asociación autopercepción y haplogrupos *23*

Discusión **24**

Composición étnico-racial *24*

Hemoglobinopatías *25*

Haplogrupos mitocondriales *27*

Conclusiones **29**

Bibliografía **30**

Anexo 1 ..... **34**

Anexo 2 ..... **35**

Anexo 3 ..... **37**

Anexo 4 ..... **39**

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión del presente trabajo.

A la primera persona que deseo agradecer es a mi tutor el Dr. Arley Camargo que me brindó su ayuda y conocimiento en el transcurso de este proceso alentándome a que concluyera la investigación.

Mis agradecimientos también se dirigen al Dr. Julio Da Luz, co-tutor del proyecto, quien dedicó asesoramiento científico y otorgó muestras para los análisis genéticos correspondientes.

Soy grata a la ayuda brindada por la Lic. Laura Lima quien con paciencia me enseñó y me guio en el manejo de las técnicas de laboratorio que implicó el estudio.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, principalmente a la Mag. Sara Flores quien con dedicación y compromiso ofreció su tiempo para ayudarme en el análisis de datos mediante herramientas bioinformáticas.

Agradezco también a la coordinadora de la carrera en el interior Lic. Isabel Volz y a la Comisión Coordinadora de Carrera de la Licenciatura en Biología Humana que otorgó el sostén necesario para que se cumpla este proyecto

Este trabajo fue posible gracias a la importante contribución de las autoridades y del personal del Hospital de Rivera que brindó muestras de sangre de pacientes para los análisis pertinentes.

Sin dudas el Centro Universitario de Rivera ha contribuido muchísimo dado que es la institución que me ha ofrecido formación de calidad y apoyo incondicional.

Resumen

Estudios recientes en nuestro país han mostrado la presencia de varios tipos de mutaciones de pérdida o reducción de función en los genes de las globinas humanas. Debido al origen étnico de las poblaciones uruguayas, con importantes contribuciones del Mediterráneo y África, se espera que la prevalencia de hemoglobinopatías tienda a ser más alta en la zona norte del país. El propósito de este trabajo fue realizar un diagnóstico de los polimorfismos genéticos de hemoglobinopatías vinculadas a la anemia falciforme y talasemias, a partir de una muestra obtenida del Hospital de Rivera mediante la aplicación de técnicas de biología molecular. El estudio consistió en la recolección de muestras de sangre obtenidas en el laboratorio del Hospital de Rivera, la encuesta a los participantes de la investigación que brindaron su consentimiento informado, y la realización de los análisis genéticos de las muestras, incluyendo la extracción, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y secuenciación de ADN. Además, se realizó un submuestreo con la finalidad de analizar el ADN mitocondrial para determinar los haplogrupos humanos a los que pertenecen los participantes. Este estudio permitió evaluar distintas técnicas moleculares para detectar hemoglobinopatías en regiones poco estudiadas del país y comparar la autopercepción étnico-racial con la asignación a haplogrupos mitocondriales.

Introducción

Hemoglobinopatías

Los polimorfismos a nivel del ADN que genera la sustitución de nucleótidos por el proceso mutacional permiten identificar el origen genético de algunas enfermedades, así como reconocer los patrones de ancestralidad en poblaciones humanas. Los polimorfismos pueden clasificarse como autosómicos (de herencia biparental y ligados a cromosomas no sexuales), uniparentales (ligados al genoma mitocondrial o al cromosoma Y, heredados de la madre o del padre, respectivamente), y los ligados al cromosoma X (Klug et al., 2006). Los últimos son importantes porque pueden proporcionar un patrón claro de eventos históricos que no están afectados por factores de recombinación (Bisso et al., 2011). Un obstáculo en la identificación de variantes genéticas asociadas a enfermedades es la comparación de casos y controles procedentes de poblaciones con diferentes antecedentes genéticos. En este sentido, es importante establecer el grado de estructura genética en las poblaciones debido a la distribución diferencial de los polimorfismos asociados a una enfermedad de interés (Rondón & Barreto, 2013).

Las hemoglobinopatías abarcan un grupo diverso de trastornos causados por la alteración estructural y/o de expresión de los genes de las globinas que codifican las subunidades que conforman el tetrámero de la hemoglobina (Hb) (Eandi et al., 2015). Las hemoglobinopatías están extendidas por todo el mundo y según la Organización Mundial de la Salud casi el 7% de la población mundial tiene alguna hemoglobinopatía (Weatherall & Clegg, 2001). Las hemoglobinopatías son las enfermedades monogénicas más comunes en el mundo como resultado de la ventaja heterocigótica frente a la malaria en las regiones tropicales de África y Asia (Steinberg et al., 2001; Weatherall & Clegg, 2001). Sin embargo, las hemoglobinopatías se encuentran prácticamente distribuidas en todo el mundo como resultado del comercio de esclavos desde África (Da Luz et al., 2006).

La anemia falciforme es una hemoglobinopatía causada por la síntesis de una hemoglobina estructuralmente anormal (HbS) que difiere en una sola sustitución nucleotídica de la HbA normal (Eandi et al., 2015). La mutación que

produce la HbS presenta un cambio de una base en la segunda posición del codón 6 del primer exón del gen HBB (GAG→GTG), lo cual produce una sustitución de ácido glutámico por valina (Durán et al., 2012). La anemia falciforme (también llamada anemia drepanocítica o drepanocitosis) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva frecuente asociada con episodios de dolor agudo y daños progresivos en diferentes órganos (Pawloski et al., 2005). Fue la primera enfermedad de origen molecular reportada en el mundo, y en la actualidad es la hemoglobinopatía más frecuente, con más de 250 millones de portadores a nivel mundial (Rees et al., 2010).

La mutación que produce la HbS es especialmente frecuente en personas con antepasados originarios del África subsahariana, India, Arabia Saudita o los países del Mediterráneo. Las migraciones incrementaron la frecuencia de este alelo (mutación) en el continente americano (OMS, 2006). El alelo de la drepanocitosis se ha hecho frecuente en África porque el rasgo drepanocítica confiere cierta resistencia al paludismo por el protozoario parásito *Plasmodium falciparum* durante una fase crítica de la primera infancia, favoreciendo así la supervivencia del huésped y la consiguiente transmisión del alelo de la HbS. Aunque la presencia del alelo de la HbS en estado heterocigoto puede proteger contra el paludismo, la homocigosis para este alelo produce anemia drepanocítica. En consecuencia, los homocigotas normales tienen alta mortalidad por paludismo, mientras que los homocigotas para HbS sufren de anemia drepanocítica y, por lo tanto, los heterocigotas tienen una ventaja sobre los dos homocigotas (OMS, 2006).

Las talasemias son hemoglobinopatías causadas por la síntesis reducida o ausente de una o más cadenas de las globinas α y β. La α-talasemia es uno de los desórdenes hereditarios más frecuentes mundialmente (Scheps et al., 2015). Se estima que el 5% de la población mundial es portadora de alguna mutación α-talasemia (Weatherall, 2008). Prevalece en regiones tropicales y sub-tropicales (el sub-Sahara Africano, Mediterráneo, Oriente Medio, el subcontinente Indio y el sudeste de Asia), coexistiendo en regiones donde está difundida la malaria, que ejerció una presión evolutiva positiva sobre las mutaciones de α: talasemia (Higgs & Weatherall, 2009). A diferencia de la HbS, existen muchas mutaciones distintas en el gen HBB que producen beta

talasemias. Por ejemplo, las mutaciones más frecuentes en poblaciones mediterráneas se encuentran en el primer exón y en el primer intrón. Aunque menos frecuentes que en poblaciones mediterráneas, las poblaciones africanas también presentan mutaciones de β-talasemia, ubicadas principalmente en la región promotora del gen HBB (Da Luz et al., 2006).

Se han realizado algunos estudios previos que han caracterizado los tipos y la incidencia de las mutaciones particulares causantes de hemoglobinopatías en Uruguay (Da Luz et al., 2006, 2013). La frecuencia alélica observada de la mutación S (0,38%) no se puede extrapolar a la población uruguaya ya que la mayoría de las muestras provenían de un hospital público de Montevideo, pero, sin embargo, esta frecuencia fue similar al estimado para la población uruguaya (0,3%) (Da Luz et al., 2006). Además, esta frecuencia aumentó al 1,1% para los individuos de origen africano (Da Luz et al., 2013). Hubo una mayor diferencia entre la frecuencia en la población uruguaya con las poblaciones del noreste del Brasil donde hay una mayor contribución de poblaciones africanas (Da Luz et al., 2006). Solo una de las tres mutaciones investigadas responsables de talasemias fue detectada (la deleción $-\alpha^{3,7}$), la cual es característica de poblaciones africanas (Da Luz et al., 2006).

Debido al origen étnico de las poblaciones uruguayas, con importantes contribuciones del Mediterráneo y África, se espera que la prevalencia de hemoglobinopatías tienda a ser incluso más alta en la zona norte del país (Sans et al., 1997). Se ha encontrado que la frecuencia de genes africanos varía de 20% en Tacuarembó a 8% en Montevideo, con un valor similar a este último para todo el país 3-5% (Sans et al., 1997). Además, en base al Censo de Población del 2011 realizado por el Instituto Nacional de Estadística, el porcentaje de población con ancestros africanos (afrodescendientes) en Rivera y Artigas alcanza al 17% (siendo los más altos del país), seguido por Cerro Largo, Salto y Tacuarembó con un 10% (Cabella et al., 2013).

Haplogrupos mitocondriales

Desde su desarrollo a finales de los años 80, el estudio de la variabilidad del DNA mitocondrial (mtDNA) de las poblaciones humanas se ha convertido en una poderosa herramienta. Con ella se ha rastreado y reconstruido la historia

evolutiva de las poblaciones humanas (Fernández, 2005). Las mitocondrias y los cloroplastos constituyen sistemas genéticos secundarios de las células eucariotas y presentan herencia citoplasmática, caracterizada por proporciones de segregación no mendeliana. La herencia de los genes mitocondriales en mamíferos es materna, en virtud que las mitocondrias del embrión son proporcionadas por el óvulo (Figueiro, 2006). El genoma mitocondrial consiste en una única molécula de ADN circular con varias ventajas para estudios evolutivos: alto número de mitocondrias, gran cantidad de moléculas de ADNmt organizados en nucleoides, lenta degradación de las mitocondrias, tasa de mutación promedio 5 a 10 veces mayor que el ADN nuclear, y ausencia de recombinación, entre otras.

La región codificante del ADN mitocondrial ocupa más del 90% del genoma mitocondrial, mientras que la región control (RC) no codificante tiene una tasa de mutación de 8,4% por millón de años, entre dos a cuatro veces mayor que en la región codificante. La RC constituye un fragmento de aprox. 1.000 pares de bases (pb), relacionada con el origen de replicación y que consiste de tres regiones Hipervariables (HVRI, HVRII, y HVRIII) (Cavalli-Sforza, 1981; Zambrano, 2004; Pakendorf & Stoneking, 2005; Pereira Dos Santos, 2005). En particular, las HVR I y II (ubicadas en las posiciones 16024-16383 y 57-372 del ADNmt humano según Anderson et al., 1981) presentan una alta tasa de mutación (Figueiro, 2006). En el ser humano, las tasas de mutación promedio estimadas para las regiones HVR I y II son de 224 y 274 mutaciones por sitio por millón de generaciones, respectivamente (Heyer et al., 2001).

Los estudios de ADN mitocondrial (ADNmt) en diversas poblaciones han revelado un número importante de sitios polimórficos estables en la región codificante, que definen grupos relacionados de ADN mt denominados haplogrupos (Postillona et al., 2009). Si asumimos que el ADN mt se hereda en bloque, podemos considerar todo el genoma mitocondrial como un locus en el que la combinación de mutaciones, inserciones y deleciones constituirían un alelo o haplotipo mitocondrial (Fernández, 2005). Podríamos definir un haplogrupo o cluster mitocondrial como una agrupación de haplotipos que comparten ciertas sustituciones diagnósticas (definidas por enzimas de restricción o por secuenciación directa) y presentan un origen común. Esto

implica que los polimorfismos que definen cada haplogrupo se produjeron exclusivamente en las líneas antecesoras de todos los haplotipos que lo integran (Fernández, 2005).

La nomenclatura inicial propuesta por Wallace y Torroni (Torroni et al., 1992) identifica los haplogrupos principales designándolos con una letra mayúscula (Ej.: A, B, C, D, H, I, L, U, V). Los haplogrupos pueden dividirse, a su vez, en subhaplogrupos que se designan por su letra correspondiente seguida de un número (ej.: L2). Las subdivisiones al nivel siguiente se realizan alternando letras minúsculas y números (ej.: U5a1b) (Fernández, 2005). La variabilidad conocida y descrita hasta el momento para haplogrupos (hpgs) del ADNmt es la siguiente:

Hpg L: Característico de poblaciones africanas con frecuencias que alcanzan casi el 100% en el oeste y este del continente, con varias subdivisiones para variantes poblacionales específicas (Morelli et al., 2000).

Hpgs H, I, J, K, M, T, U, V, W y X: Característicos de poblaciones europeas. Sus frecuencias varían según la región, por ejemplo: los hpgs H y U más frecuentes en el este, y el V dentro en la Península Ibérica (Morelli et al., 2000). Los hpgs más recientes en escala evolutiva son el V y el T (Pereira et al., 2001).

Hpgs A, B, C y D: Característicos de poblaciones asiáticas y americanas nativos; las subdivisiones A2, B2, C1 y D1 son los más frecuentes, los cuales varían entre Asia, Norte y Sudamérica (Schurr, 2000). El haplogrupo X también se encuentra en América del Norte. Más recientemente se identificaron hasta 14 haplogrupos “fundadores” (Sans, 2014).

El proceso de formación de las poblaciones latinoamericanas es complejo e involucra diversos orígenes. Por ejemplo, indígenas, africanos y europeos conformaron, con aportes desiguales, la población uruguaya (Sans et al., 2009). La población uruguaya ha sido considerada de ascendencia europea, ya que sus poblaciones nativas víctimas de genocidio en el pasado y aparentemente desaparecieron en el siglo XIX. Contradiciendo esta creencia nacional, los estudios genéticos han demostrado una contribución nativa

sustancial. Por ejemplo, un estudio de la población actual de los Departamentos de Tacuarembó y Cerro Largo, se concluyó que el 59% de la población de Tacuarembó y el 30% en Cerro Largo tienen haplogrupos indígenas (Sans et al., 2001). En general, se ha encontrado que un tercio de la población uruguaya posee un antepasado materno indígena, lo cual se explica por las uniones unidireccionales entre mujeres indígenas y hombres europeos que ocurrieron en todo el continente (Sans, 2000; Sans et al., 2006). Las poblaciones uruguayas tienen frecuencias altas de haplogrupos B y C, seguida por el A y, por último, D; sin embargo, en Montevideo predomina el A. Esta diferencia entre Montevideo y el resto del país podría deberse a un aporte guaraní en Montevideo y a un aporte charrúa en el interior del país, ya que el haplogrupo A es frecuente en guaraníes actuales y el C en indígenas pampeanos, patagónicos y chaqueños (Sans, 2014). De todas formas, la continuidad genética entre las poblaciones prehistóricas, históricas y actuales aún no está del todo claro (Sans et al., 2012; Sans, 2014). En ese sentido, un estudio reciente indica que gran parte del acervo genético original indígena se ha preservado en las poblaciones mestizas de Uruguay y sur de Brasil (Tavares et al., 2019).

Objetivo General

Identificar polimorfismos en los genes de las globinas asociados con la anemia falciforme y α-talasemia, y polimorfismos en el ADN mitocondrial, a partir de una muestra proveniente del Hospital de Rivera.

Objetivos Específicos

- Caracterizar a los participantes en base al sexo, edad, lugar de nacimiento y autopercepción étnico-racial.
- Detectar la mutación $-\alpha^{3,7}$ del gen α-globina asociado a α-talasemia.
- Detectar la variante anormal HbS del gen β-globina asociada a la anemia falciforme.

- Comparar las frecuencias de las mutaciones obtenidas con las frecuencias reportadas para otros Departamentos del país y otras regiones.
- Estimar el origen ancestral por vía materna a través del ADN mitocondrial mediante la asignación de los individuos estudiados a haplogrupos y haplotipos
- Analizar las frecuencias de cada haplogrupo y las mutaciones específicas que definen diversos haplotipos para determinar el origen de los individuos.
- Comparar la autopercepción de los participantes sobre su pertenencia a un grupo étnico con la asignación genética a haplogrupos/haplotipos

Objetivos Académicos

- Entrenamiento en técnicas de laboratorio para la obtención y el análisis de secuencias de ADN.
- Interacción académica con investigadores de otros laboratorios involucrados en genética humana del CENUR Litoral Norte y del IIBCE.
- Realización de un estudio científico para su eventual aporte al conocimiento básico y aplicado de los resultados de la investigación.
- Elaboración y ejecución de un proyecto de investigación y difusión de los resultados a través de un informe de pasantía.

Materiales y Métodos

Muestras de sangre y encuesta

Se obtuvieron 100 muestras de sangre de pacientes del Hospital de la Ciudad de Rivera a partir de un muestreo semanal (20 muestras/día) en julio de 2018. Los participantes fueron seleccionados entre aquellos individuos que asistieron al laboratorio del Hospital de Rivera para realizarse extracciones de sangre utilizados en estudios de rutina (ej., hemograma). Luego de la extracción, se les consultó sobre su interés en participar del estudio y posteriormente se aplicó una encuesta a cada uno de los participantes con el fin de obtener información sociodemográfica. A través del cuestionario se obtuvieron datos como edad,

sexo, lugar de origen, y autopercepción étnico-racial, así como sus antecedentes en cuanto a casos de anemia a nivel personal y familiar (Anexo 1). El presente estudio fue avalado por el Comité de Ética en Investigación Institucional del CENUR Litoral Norte (Exp. N° 311170-001025-18) y autorizado por la Dirección del Hospital de Rivera.

Extracción de ADN a partir de sangre entera

Las extracciones de sangre fueron realizadas por dos profesionales de la salud (Enfermeras del Hospital) quienes recolectaron 5ml de sangre periférica de cada individuo. Los 100 tubos de sangre con anticoagulante EDTA fueron transportados al Laboratorio de Biogeografía y Evolución del CUR en una heladera portátil para su adecuada conservación. Las muestras de sangre fueron congeladas para su posterior análisis. Se tomaron las medidas apropiadas de aislamiento para evitar la contaminación de las muestras (extracción de ADN en gabinete con luz UV o flujo laminar ubicada en el Laboratorio de Química Ambiental del CUR).

Se utilizó el protocolo Quick-DNA Universal Kit (Zymo Research) con el cual se obtuvo ADN a partir de una muestra de 200 microlitros (ul) de sangre entera en la mayoría de las muestras, mientras que en algunas se logró obtener ADN a partir del plasma. Posteriormente se efectuó la cuantificación del ADN y evaluación de su pureza mediante espectrofotometría y la utilización del espectrofotómetro de nanovolúmenes Genova Nano (Jenway).

Identificación de HbS mediante ARMS-PCR

Con la excepción de algunas deleciones y reordenamientos raros, las lesiones moleculares que causan hemoglobinopatías son todas identificables mediante técnicas basadas en PCR (Clark et al., 2004). En este estudio, se amplificaron fragmentos de las globinas para intentar detectar el alelo HbS y la mutación -$\alpha^{3.7}$ causante de una α-talasemia utilizando oligonucleótidos y ciclado de temperaturas de la bibliografía (Da Luz et al., 2013; Singh et al., 2015).

Se determinó la presencia del alelo de la mutación de HbS mediante PCR específicamente diseñado para detectar esta variante, así como el alelo normal. El método más utilizado es ARMS-PCR (*amplification refractory*

mutation system; Newton et al., 1989; Old et al., 1990) el cual teóricamente puede detectar cualquier mutación conocida o deleción de una sola base (Clark & Thein, 2004). La reacción de ARMS-PCR incluyó entre 10-30 ng de ADN, 0,5 ul de los cebadores C1 y CD6 a 10 mM (ó HbS) (Singh et al., 2015), 2,5 ul de dNTPs a 40 mM, 2.5 ul de buffer 10X y 0,375 ul de $MgCl_2$ y 0,25 ul de Taq polimerasa para un volumen final de 20 ul por reacción.

Para cada muestra de ADN se realizaron dos ARMS-PCR, uno etiquetado como normal (N) y otro como mutante (M). En cada tubo agregamos un primer en común (C1), mientras que en el tubo N se añadió el primer CD6 y en el tubo M se agregó el primer específico para la mutación (HbS). Tanto el producto del tubo N como del tubo M se visualiza como una banda de 207 pb. La amplificación sólo en el tubo N se considera que representa el homocigota HbA/HbA, mientras que la amplificación en los dos tubos (N y M), representa al heterocigota HbA/HbS.

Para validar el sistema de PCR se agregó un control negativo (sin ADN) y un control positivo con una muestra conocida de un paciente portador de la mutación HbS. La amplificación se efectuó en un termociclador Arktik (Thermo Scientific), e incluyó un primer ciclo de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 65 °C y 1 minuto y medio a 72 °C, y una extensión final de 3 minutos a 72 °C (Singh et al., 2015).

Identificación de HbS mediante RFLP-PCR

La técnica PCR-RFLP es utilizada para ubicar algunos de los polimorfismos ya definidos, donde PCR amplifica aquellos segmentos directos de ADN que, posteriormente, serán digeridos por enzimas o endonucleasas que cortan selectivamente el ADN en secuencias específicas (entre 4 y 8 pb), conocidas como sitios de restricción o de reconocimiento. La presencia o ausencia del corte comprobará el polimorfismo en cuestión (Klug & Cummings, 1999).

Se seleccionaron 15 muestras para la aplicación de la técnica molecular RFLP-PCR, incluyendo como control positivo una muestra conocida con el alelo HbS. Las condiciones para la amplificación del fragmento que incluye el sitio de restricción fueron las siguientes: 10-30 ng de ADN, 0,5 ul del cebador C1 a 10

mM, 0,5 ul del cebador β-glo-R a 10 mM, 2,5 ul de dNTPs a 40 Mm, 2.5 ul del buffer 10X, 0,25 ul de Taq polimerasa, y 0,375 ul de $MgCl_2$, para un volumen final de 20 ul. Para amplificar los fragmentos de interés se utilizó un programa de ciclado que incluyó un primer ciclo de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto y medio a 72 °C, y una extensión final de 3 minutos a 72 °C.

Luego de la electroforesis de los productos de PCR (ver más abajo) para detectar si hubo amplificación, se procedió a la digestión de los productos de PCR con una enzima de restricción. Las condiciones fueron las siguientes: 270 ul de agua, 30 ul de Buffer Tango y 15 ul de la enzima HpyF3I. En cada tubo se colocó 21 ul del mix + 10 ul del producto de PCR. Luego se incubó en el termociclador a 37 °C por 16 horas. Al finalizar se efectuó la electroforesis de los productos obtenidos.

Identificación de α-talasemia delecional

Se aplicó la técnica de Gap-PCR para la detección de deleciones que causan α-talasemia (Clark & Thein, 2004). Este estudio se enfocó en la detección de la deleción $-\alpha^{3.7}$ en la globina α con los siguientes oligonucleótidos específicos α2/3.7-F, 3.7/20.5-R, y α2-R de Tan et al. (2001). Las condiciones del método PCR-GAP para la amplificación del alelo fueron las siguientes: 2 ul de ADN, 1 ul del primer α2/3.7; 0.5 ul de los primers 3.7/20.5-R y α2-R; 12,5 ul de Ranger Mix (Bioline) que utiliza una polimerasa de alta fidelidad. En cada tubo de PCR se colocaron 23 ul de la mezcla y 2 ul de ADN. Para amplificar los fragmentos de interés se utilizó un programa de ciclado que incluyó un primer ciclo de desnaturalización de 96 °C para 15 minutos, seguido de 30 ciclos de: 45 segundos a 98 °C, 1 minuto y medio a 59 °C, 2 minutos y 15 segundos a 72 °C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. La amplificación de una banda de 207 pb bajo la luz ultravioleta diagnostica la deleción $-\alpha^{3.7}$.

Electroforesis de productos de PCR

Para la identificación de polimorfismos, los productos del PCR fueron sometidos a un campo eléctrico en una cubeta de electroforesis para producir la migración de los fragmentos en un gel de agarosa los cuales son separados

según su tamaño. Se mezclaron 5 o 10 ul de producto de PCR y 1,5 ul de tinción de carga (Bioline) y fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% teñido con 2 ul de GoodView (SBS Genetech). El marcador de peso molecular utilizado corresponde a 100 (Cleover) o 1000 (Bioron) pb. Se utilizó el buffer 1X TAE para la corrida de electroforesis durante 45 minutos a 80 voltios. Las bandas obtenidas se visualizaron al exponerlas a luz UV.

Haplogrupos mitocondriales

Se realizó un submuestreo a partir de las 100 muestras obtenidas en el Hospital de Rivera. Fueron seleccionadas 31 muestras pertenecientes a individuos que nacieron en Rivera y que se autoperciben respecto a su grupo étnico-racial como indígenas, afrodescendientes y europeos.

Para realizar la amplificación de un fragmento de la región HVR-I se utilizaron los oligos: 15997F: 5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3' (Sans et al., 2011) y 011R: 5'-GCTCAGTGGTTATTAGGGTTCTCGTCCCCATGGAT-3' (Sans et al., 2012). Para la región HVR-II se usaron los oligomeros 16372F: 5'-CCCTTCTCGTCCCCATGGAT-3' (Kemp et al., 2007) y 397R: 5'-CATACCCGCCAAAAGATAAAAT-3' (Sans et al., 2011). Las condiciones del método de PCR para la determinación de la región HVR-I fueron las siguientes: 10-30 ng de ADN, 0,4 ul de los cebadores a 10 mM, 2,5 de dNTPs a 40 mM, 2,5 ul del buffer 10X, 0,375 ul de MgCl2, y 0,25 ul de Taq polimerasa, para un volumen final de 20 ul por reacción.

La amplificación se efectuó en un termociclador Arktik (Thermo Scientific), e incluyó un primer ciclo de desnaturalización de 94 °C por 5 minutos; desnaturalización a 94 °C por 30 segundos; hibridación a 58 °C por 3 segundos; extensión a 72 °C por 40 segundos; luego se repitieron los pasos 2 al 4 por 35 ciclos y una etapa final de 72 °C por 5 minutos (Sans et al., 2012). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis (ver más arriba). Los fragmentos a visualizar para la HVR-I es de 629 pb y para la HVR-II de 635 pb.

El producto amplificado se purificó y se secuenció en Macrogen (www.macrogen.com). Para la visualización de las secuencias de ADNmt se

empleó el programa Chromas Pro2.4.1 (technelysium.com.au/wp/chromas/) y para el alineamiento de secuencias se empleó BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Para la asignación de los haplogrupos y haplotipos de los individuos estudiados se utilizó el programa HaploGrep 2.0 (haplogrep.uibk.ac.at).

Resultados

Participantes

Se encuestaron a 100 participantes con un rango de edad entre 4 y 89 años (mediana = 50, rango intercuartílico = 28; Figura 1), de los cuales 69 fueron mujeres (Tabla 1). Un 16% se autoidentificó como afrodescendiente, 28% como europeo, y 14% indígena, un individuo de origen musulmán (1%) y dos individuos de origen asiático (Figura 2, Anexo 2). Respecto al lugar de origen de los participantes, el 75% es originario de Rivera, el 11% de Montevideo y el 7% de Rio Grande do Sul (Brasil), mientras que el porcentaje restante pertenece a Departamentos como Salto, Canelones y Paysandú (Figura 3). El 27% de los encuestados manifestó haber sufrido o sufrir de anemia.

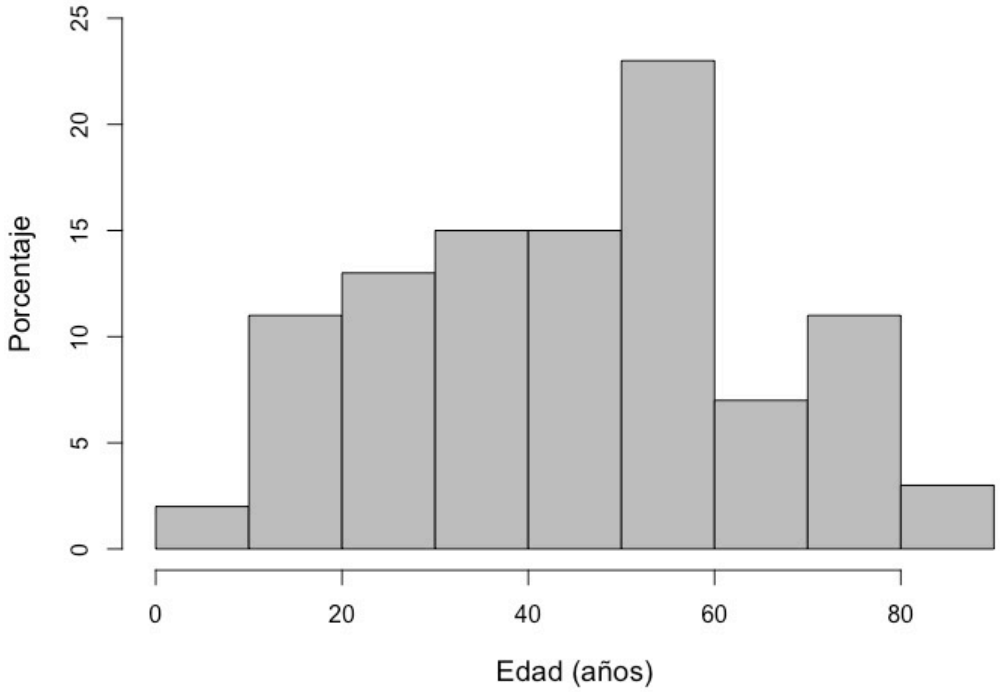

Figura 1. Edades de todos los participantes del estudio.

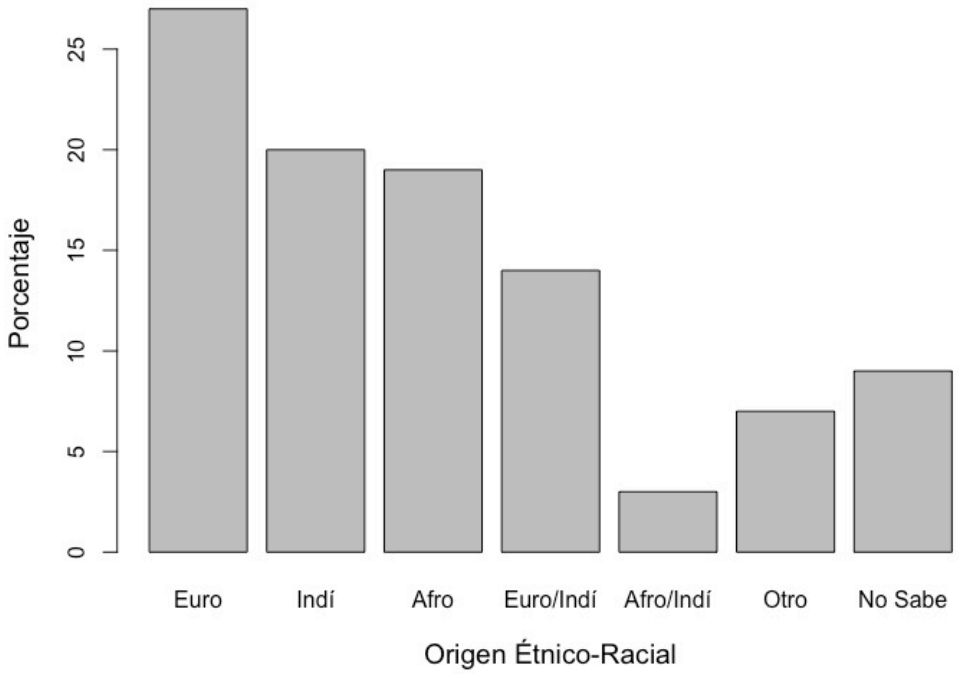

Figura 2. Origen étnico-racial de todos los participantes del estudio.

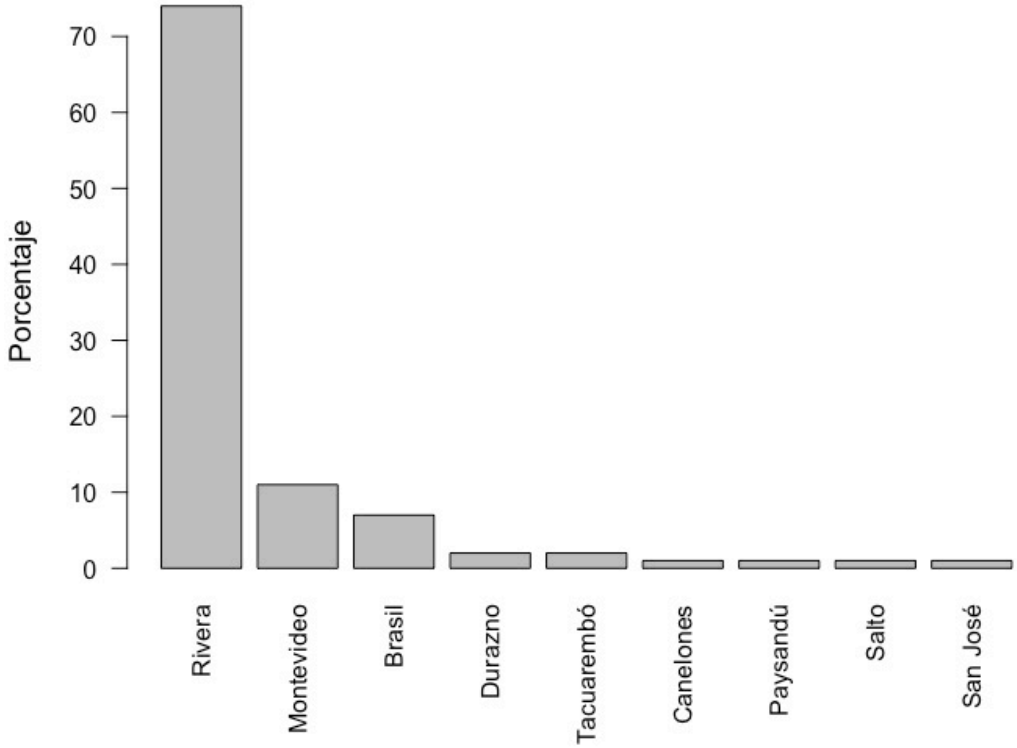

Figura 3. Lugar de nacimiento de todos los participantes.

Tabla 1. Frecuencia absoluta de las variables encuestadas en los 100 participantes. NS = no sabe.

Variable	Frecuencia absoluta
Sexo: Mujer	69
Sexo: Hombre	31
Edad: 0 a 10 años	2
Edad: 11 a 18 años	4
Edad: 19 a 25 años	18
Edad: 26 a 35 años	5
Edad: 36 a 59 años	48
Edad: mayor de 59 años	23
Origen: Europeo	27
Origen: Europeo/indígena	15
Origen: Afro	19
Origen: Afro / indígena	3
Origen: Indígena	20
Origen: Asiático	2
Origen: Otro	5
Origen: NS	9
Anemia: Si	27
Anemia: No	72
Anemia: NS	1
Anemia en padres: Si	9
Anemia en padres: No	84
Anemia en padres: NS	7
Anemia en abuelos: Si	5
Anemia en abuelos: No	80
Anemia en abuelos: NS	15

Las muestras con mayor concentración de ADN se visualizaron como bandas muy intensas y sin degradación en los geles de agarosa (Figura 4). La intensidad de las bandas en los geles se correspondió en general con las

concentraciones de las muestras, y aquellas con concentraciones muy bajas, o iguales a cero, no amplificaron (Anexo 3). En general, las extracciones realizadas a partir de plasma tuvieron valores más altos de concentración y pureza que las realizadas a partir de sangre entera (Anexo 4).

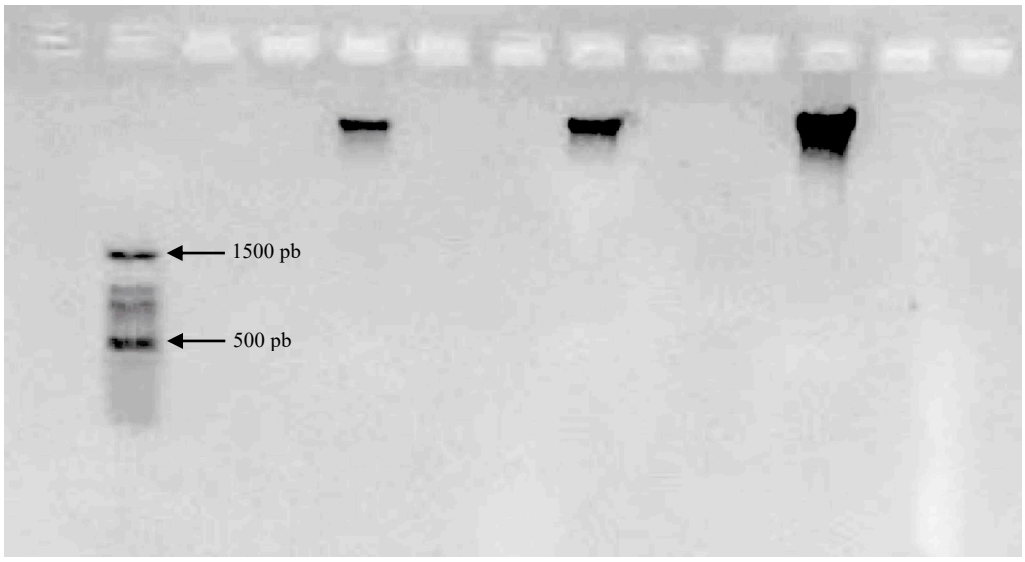

Figura 4. Electroforesis de geles de agarosa con ADN extraído de tres muestras. A la izquierda aparece el marcador de peso molecular de 100 pb.

Hemoglobinopatías

Para la detección del alelo HbS se analizaron un total de 92 muestras con el método ARMS-PCR y 20 muestras con el método RFLP-PCR. El método de ARMS-PCR fue validado ya que la muestra de control positivo (con ADN de portador del alelo HbS) resultó en una amplificación exitosa en los tubos N y M, correspondiente a un heterocigota HbA/HbS (Figura 5). Sin embargo, los PCR realizados para detectar portadores de anemia falciforme mostraron amplificación del alelo normal pero no detectaron la presencia del alelo HbS (Figura 6). Asimismo, mediante la técnica RFLP-PCR se logró amplificar el fragmento de interés, pero no se pudo detectar el alelo HbS luego de la digestión del amplicón, corroborando que no existen portadores de anemia falciforme en la muestra estudiada. Para la detección de α-talasemia delecional se utilizó la técnica de Gap-PCR en 94 muestras. Se logró amplificar el alelo normal del gen α2, pero no se logró amplificar un fragmento consistente con la

mutación -$\alpha^{3.7}$ (Figura 7). En este caso, sin embargo, no se incluyó un control positivo por la falta de una muestra con este tipo de mutación.

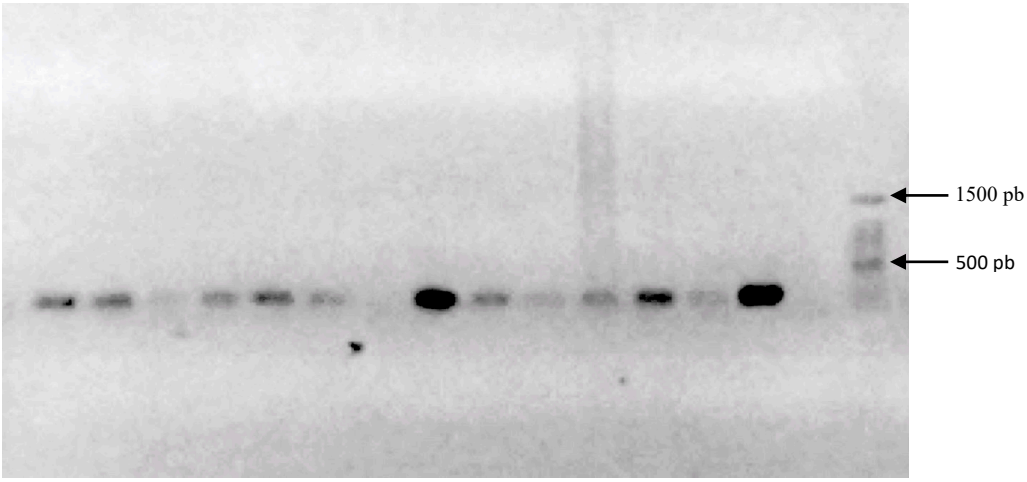

Figura 5. Electroforesis de productos de ARMS-PCR. Todas las bandas corresponden al alelo normal HbA (aprox. 200 pb). A la derecha aparece el marcador de peso molecular de 100 pb.

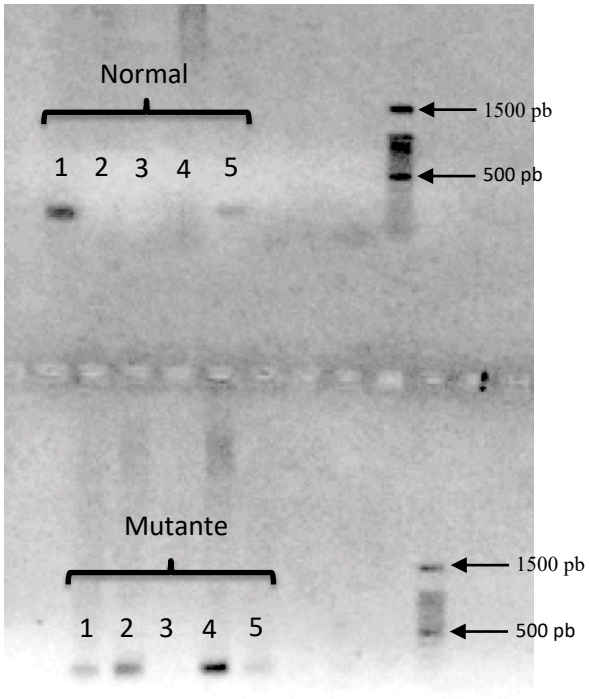

Figura 6. Electroforesis de productos de ARMS-PCR con muestras utilizadas como control positivo. En la parte superior se observan los productos de PCR etiquetados como normales y en la región inferior los etiquetados como mutantes (aprox. 200 pb). A la derecha aparece el marcador de peso molecular de 100 pb.

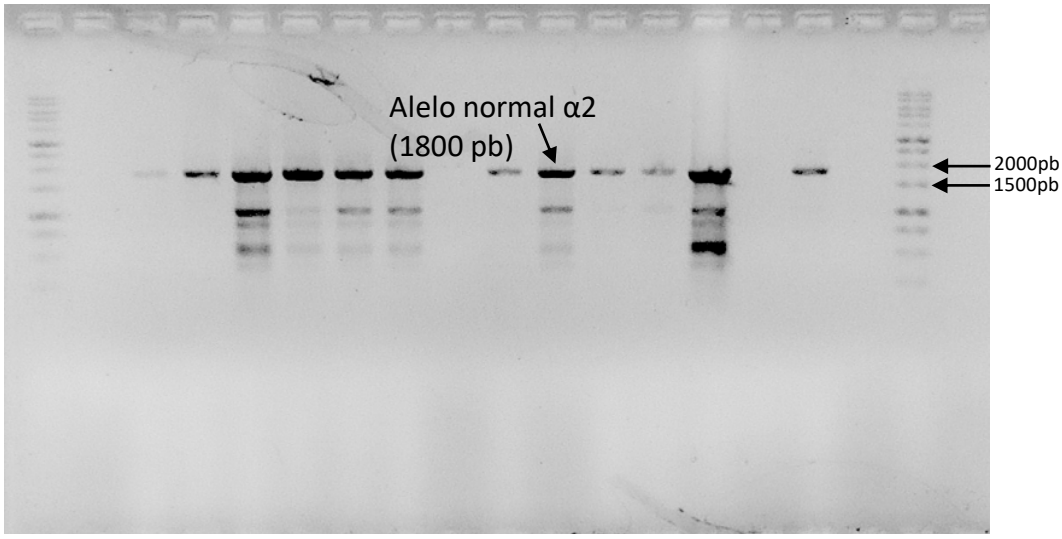

Figura 7. Electroforesis de productos de gap-PCR para detección de alfa-talasemia. A la derecha aparece el marcador de peso molecular de 1000 pb.

Haplogrupos mitocondriales

Se obtuvieron productos de amplificación de gran calidad tanto para la región HVRI (Figura 8) como para la región HVRII (Figura 9). Los cuatros haplogrupos fundadores de nativos americanos (A, B, C y D) fueron detectados en la población de Rivera, donde representaron el 51,6% de los linajes maternos. Los haplogrupos A y C fueron los más frecuentes con un 38%, respectivamente, seguido del haplogrupo H en 12,9%, mientras que el haplogrupo L corresponde al 19,4% de la muestra (Tabla 2).

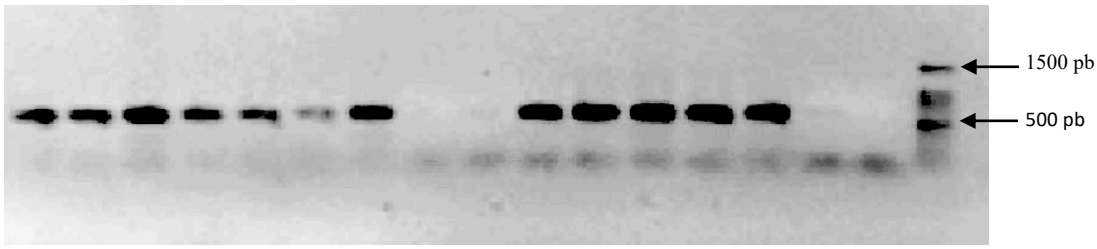

Figura 8. Electroforesis de productos de PCR de la región HVRI (aprox. 630 pb). A la derecha aparece el marcador de peso molecular de 100 pb.

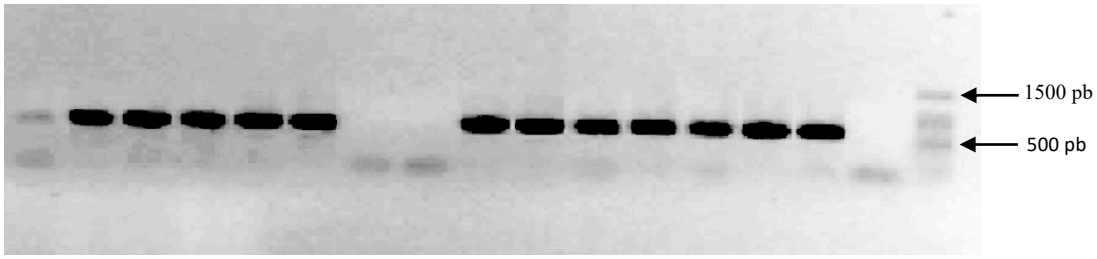

Figura 9. Electroforesis de productos de PCR de la región HVRII (aprox. 630 pb). A la izquierda aparece el marcador de peso molecular de 100 pb.

Tabla 2. Haplogrupos de ADNmt de participantes del Hospital de la Ciudad de Rivera.

Origen	N (%)	Haplogrupos	N (%)
Indígena	16 (51,6)	A2	19,4
		B2	9,7
		C1	19,4
		D1	3,2
Europea	9 (29,0)	H	12,9
		J	3,2
		R	3,2
		U	9,6
Africana	6 (19,4)	L	19,4

Los 31 individuos estudiados se autopercibieron respecto a su origen étnico-racial como europeos, indígenas, afrodescendientes, afrodescendiente/ europeo/indígena, europeo/indígena, y afrodescendiente/indígena (Tabla 3). De los 16 individuos que presentan haplogrupo indígena (A, B, C, D), nueve se autopercibieron como indígenas. Los nueve individuos que presentan haplogrupo europeo (H, J, R, U), dos se autopercibieron como europeos. Seis individuos presentan haplogrupo africano (L), de los 31 individuos de la muestra 13 se autopercibieron como afrodescendientes. Dos individuos se autopercibieron como afrodescendientes/europeos/indígenas, dos individuos como afrodescendientes/indígena y tres como europeo/indígena (Tabla 3).

Tabla 3. Haplogrupos de ADNmt y autopercepción respecto al origen étnico de los participantes. El participante 17 fue excluido del estudio y por ello hay un participante identificado como 101.

Individuo	Haplogrupo	Haplotipo	Autopercepción
13	A	A2+(64)	Indígena
31	A	A15	Afrodescendiente
47	A	A2	Afrodescendiente
57	A	A2+(64)+@16111	Indígena
86	A	A6b	Europeo/indígena
100	A	A2+(64)+…	Europeo/indígena
19	B	B4	Indígena
52	B	B2b3a	Afrodescendiente
93	B	B2i1	Indígena
12	C	C1b2	Indígena
82	C	C1	Afrodescendiente
84	C	C1b11	Afro/indígena
89	C	C1b2	Afro/indígena
94	C	C1a	Europeo/indígena
95	C	C1b8	Afro/europeo/indígena
96	D	D4t	Europeo
15	H	H1e1a6	Afrodescendiente
43	H	H2a2a	Afro/europeo/indígena
49	H	H32	Afrodescendiente
78	H	H7h	Indígena
33	J	J1C2H	Indígena
20	L	L2a1d	Afrodescendiente
39	L	L2a1d	Afrodescendiente
65	L	L2a1c2a	Afrodescendiente
90	L	L3b1a3	Afrodescendiente
99	L	L2a1q	Europeo
101	L	L1c3b'c	Indígena
3	R	R+16189	Indígena
36	U	U5b1d1a	Afrodescendiente
62	U	U5b2a1a2	Afrodescendiente
85	U	U5b2da1a2	Afrodescendiente

Asociación autopercepción y haplogrupos

De los individuos que se autopercibieron como indígenas (29,0%) presentan el haplogrupo indígena 6 individuos (19,4%). De los dos individuos que se autopercibieron como europeo, uno presenta el haplogrupo africano y el otro indígena, por lo que no se encontró coincidencia. De los individuos que se autopercibieron como afrodescendientes (41,9%), cuatro individuos presentan el haplogrupo africano (12,9%). Dos de los individuos (6,5%) se autopercibieron

como afrodescendientes/indígenas detectándose que un individuo presenta haplogrupo indígena y el otro africano, por lo que hubo coincidencia. Hubo coincidencia en el caso de aquellos que se autopercibieron como europeo/indígena, dado que los tres individuos (9,7%) presentan el haplogrupo indígena. Los dos individuos (6,5%) que se autopercibieron como afrodescendiente/indígena, presentan haplogrupos indígena y europeo respectivamente. Considerando a los participantes que se autoidentificaron como pertenecientes a un único grupo étnico-racial, la prueba de χ^2 reveló que no existe asociación entre la autopercepción y los haplogrupos mitocondriales (χ^2 = 2,96; grados de libertad = 4; p = 0,57) (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla de contingencia entre la autopercepción y los haplogrupos mitocondriales (observado/esperado según independencia). Prueba de independencia de chi-cuadrado: χ^2 = 2,96; grados de libertad = 4; P = 0,57).

	Haplogrupo		
Autopercepción	Europeo	Afro	Indígena
Europeo	0 / 0,67	1 / 0,50	1 / 0,83
Afro	5 / 4,33	4 / 3,25	4 / 5,42
Indígena	3 / 3,00	1 / 2,25	5 / 3,75

Discusión

Composición étnico-racial

La muestra de 100 individuos fue seleccionada al azar y sin tomar en cuenta ningún criterio de exclusión tal como la edad, sexo, lugar de origen, grupo étnico-racial y/o antecedentes de anemia. Sin embargo, el muestreo no fue representativo desde el punto de vista espacial y temporal porque todos los participantes se atendieron exclusivamente en el servicio de extracciones de sangre del Hospital de Rivera en julio de 2018. Por lo tanto, la muestra no es representativa de la población de la Ciudad de Rivera sino que también abarca la zona fronteriza con Brasil. Aunque predominaron participantes de la zona norte del país, también quedaron incluidas personas nacidas en otras partes del país y en el Estado de Rio Grande do Sul. En el Hospital de Rivera asisten pacientes de la Ciudad de Rivera pero también de la vecina Ciudad de Santana do Livramento en Brasil. Por lo tanto, muchos de los participantes y/o sus ancestros más recientes (padres y abuelos) son oriundos de otras partes del

país, así como de Rio Grande do Sul (Brasil). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio no pueden considerarse como característicos para la población de Rivera, sino mas bien, de una región un tanto difusa del noreste del país y de su zona limítrofe con Brasil.

La identificación previa del origen étnico es esencial en el diagnóstico de hemoglobinopatías, pero se vuelve menos confiable debido a una alta mezcla étnica existente en nuestra región (Clark et al., 2004). En nuestro estudio, un 16% de los participantes se auto-identificó como de origen étnico afrodescendiente, 14% indígena, 28% europeo, 2% asiático, y 1% musulmán. Además un 14% de los participantes del estudio se auto-percibió con origen mixto europeo/indígena, un 4% como afrodescendiente/indígena y un 2% afrodescendiente/europeo/indígena. Por otra parte, 13% de los encuestados desconoce su origen y 6% se auto percibió como de otro origen que no se mencionó en el cuestionario.

En la Encuesta Continua de Hogares de 1996-1997 realizado por el INE (Instituto Nacional de Estadística), el porcentaje de población de ascendencia étnico-racial europea alcanza el 93,3%, un 5,9% afro, 0,4% indígena y 0,4% asiático (INE, 1998). La distribución de la población de nuestro país según la ascendencia étnico-racial del año 2011 muestra los siguientes datos: afro 8,1%, asiática 0,5%, europea 93,9%, indígena 5,1%, y otra 0,2% (Cabella et al., 2013). Datos genéticos relevados en nuestro país por Sans et al (1997), muestra que la ascendencia étnico-racial en Montevideo es en 92% de origen europeo, 7% afro y 1% indígena; mientras que en Tacuarembó, 65% de la población es de origen europeo, 15% afro y 20% indígena. Tal como se esperaba, en nuestro estudio se encontró una alta frecuencia de participantes que se autoidentificaron como afrodescendientes e indígenas, lo cual se corresponde con lo encontrado en estudios y censos previos realizados en poblaciones de la región noreste.

Hemoglobinopatías

Mediante espectrofotometría se cuantificó el ADN de las muestras de sangre obtenidas y se halló en gran parte de ellas una baja concentración de ADN, y un bajo nivel de pureza que sugiere la presencia de contaminantes. Lo

mencionado anteriormente se podría relacionar con el hecho de que las muestras de sangre se congelaron previo a las extracciones de ADN. Las muestras congeladas son susceptibles a alteraciones en algunos de sus componentes metabólicos o celulares (SBPCML, 2010). Las muestras para ser representativas, deben mantener su composición e integridad durante la fase pre-analítica de recogida, manipulación, transporte y posible almacenamiento. Durante el proceso de almacenamiento, los elementos de la sangre pueden sufrir alteraciones, entre otras la adsorción en el vidrio o tubo plástico, desnaturalización de la proteína, así como actividades metabólicas celulares que se siguen produciendo (SBPCML, 2010). La desnaturalización de las proteínas de la sangre durante el proceso pre-analítico podría haber afectado la pureza de las extracciones de ADN. Se ha demostrado que la sensibilidad de la PCR varía según el tipo de protocolo y materiales utilizados en la extracción del ADN (Yoshikawa et al., 2011). Como en este estudio se emplearon dos procedimientos diferentes en la extracción de ADN (Quick-DNA Universal Kit y un protocolo específico para sangre), estos procedimientos pudieron resultar en diferentes resultados en la fase de PCR. Por otra parte, las mediciones en espectrofotómetro del ADN utilizado como control positivo, y que fue extraído con anterioridad en el laboratorio del Dr. Da Luz en el CENUR Litoral Norte (Udelar), sugieren una muy buena calidad del ADN que resultó en intensas bandas de amplificación (Tabla 5). Por esta razón, se considera que el almacenamiento de las muestras, y tal vez los protocolos de extracción utilizados, pudieron haber sido una de las causas de la baja sensibilidad de las técnicas basadas en PCR empleadas en este estudio.

Tabla 5. Cuantificación del ADN de las muestras de individuos portadores del alelo responsable de anemia falciforme (HbS) utilizados como control positivo.

Muestra	Concentración (ug/ml)	Muestra	Concentración (ug/ml)
1	130,330		
2	42,361	4	362,430
3	< 0,000	5	12,325

Más allá de los problemas con la calidad del ADN utilizado y la sensibilidad de las técnicas, la ausencia de portadores de los alelos de interés en este estudio (HbS y -$\alpha^{3,7}$) pudo deberse al pequeño tamaño de muestra (N=100). Por ejemplo, estudios previos han encontrado que el alelo HbS apareció en el 10% (4 de 40) de participantes afrodescendientes, y la deleción -$\alpha^{3,7}$, una mutación común causante de α-talasemia en poblaciones africanas, fue la única encontrada entre varias analizadas con una frecuencia de 15.4% (Da Luz el al., 2006). Según los estudios realizados en dos subpoblaciones afro-uruguayas, la frecuencia genotípica de los portadores de -$\alpha^{3,7}$ en el norte del país fue de 3,6% (Da Luz el al., 2006). Estos resultados sugieren que la incidencia de esta deleción es muy baja, y por lo tanto podría estar ausente, simplemente por cuestiones de azar, en una muestra pequeña de participantes afrodescendientes como la utilizada en este estudio (N = 16).

Haplogrupos mitocondriales

Hasta mediados de la década de los 80's del siglo XX se aceptaba que la población uruguaya era fundamentalmente de origen europeo, con la presencia de escasos descendientes de africanos, y se resaltaba la ausencia de remanentes de la población indígena que había habitado el territorio (Sans, 2017). Cuando en el Censo Nacional de 2011 se les preguntó a las personas sobre su autodefinición respecto a su raza o etnia, se encontró una identificación como indígena o mestizo de 2,4%, y cuando se considera la presencia de ancestros, esa cifra aumentó a 5,1%. Sin embargo, los datos genéticos muestran que como mínimo, el 34% de la población tiene ascendencia indígena. Esta discordancia entre los datos censales y los datos genéticos sugieren que sólo una fracción de las personas con ancestros indígenas se autoperciben como tales ya sea por desconocimiento, conocimiento parcial, rechazo y/o negación (Sans, 2017). En este sentido cabe mencionar que las complejidades genéticas y las diferencias étnico-raciales entre poblaciones humanas son un reflejo de la interacción de las fuerzas evolutivas y de los procesos socioculturales intervinientes (Robin & Wong, 1988 en Pereira Dos Santos, 2005; Castro de Guerra et al., 2009).

Los polimorfismos amerindios (nativos o indígenas) de ADNmt se han estudiado tanto en Montevideo como en el interior del país. En una muestra de 108 habitantes de Montevideo, los haplogrupos indígenas representaron un 20,4% de la muestra (Gascue et al., 2005). Esta frecuencia difiere fuertemente con la observada en Tacuarembó y otras zonas del país, lo que indica el alto nivel de variación dentro del Uruguay. Según datos genéticos relevados en el Departamento de Tacuarembó (N=100), el aporte europeo a los linajes maternos alcanza el 21%, el africano el 17% e indígena el 62% (Bonilla et al., 2006). En Bella Unión (N=34), el aporte europeo es de 30%, el africano de 6% y el indígena de 64% (Sans et al., 2015). Mientras tanto en Cerro Largo, el aporte europeo es de 49%, el africano de 21% y el indígena de 30% (Sans et al., 2006). Estos resultados son coherentes con un sesgo sexual en el mestizaje entre ambos componentes étnico-raciales, tomando en cuenta una inmigración europea predominantemente masculina y a las uniones direccionales con mujeres indígenas (Sans, 2017).

En el presente estudio se encontraron los haplogrupos H, J, R y U, característicos de poblaciones europeas, el haplogrupo L, característico de poblaciones africanas, y los haplogrupos A, B, C, y D, de las poblaciones indígenas. Los haplogrupos indígenas de mayor frecuencia fueron el A2 y el C1 mientras que, dentro de los haplogrupos europeos, el más frecuente fue el H. En Bella Unión, se encontraron los cuatro principales haplogrupos indígenas, siendo B2 el más frecuente, mientras que también se encontraron algunos subhaplogrupos raros (B2h, C1b2, D1f1) (Sans et al., 2015). En Tacuarembó, los haplogrupos B y C fueron los más frecuentes con 21% y 20%, respectivamente, seguidos del haplogrupo A con 13%, y del haplogrupo D con 8% de la muestra (Bonilla et al., 2006). Estos resultados sugieren que también existe variación en la prevalencia de diferentes haplogrupos indígenas entre diferentes regiones del país.

Debido al submuestreo realizado para el análisis del ADN mitocondrial, con una sobre-representación de los haplogrupos indígenas y afrodescendientes, no fue posible determinar la contribución relativa de cada grupo étnico-racial en la muestra global. Sin embargo, nuestro objetivo principal consistió en determinar el grado de correspondencia entre la asignación a haplogrupos y la

autopercepción étnico-racial. El análisis estadístico reveló que no hay asociación significativa entre los haplogrupos mitocondriales y la autopercepción en nuestra submuestra; un resultado esperado cuando en general los individuos no se reconocen como pertenecientes al grupo étnico-racial determinado por su linaje genético. En particular, se destaca que hubo un sesgo de los participantes tanto con ascendencia afro como indígena, a auto-percibirse como descendientes europeos más de los esperado (ver Tabla 4). Por otra parte, mientras que la mayoría de los afrodescendientes se auto-identificaron como tales (4 de 6), la mitad de los participantes con ADN mitocondrial indígena se identificaron como pertenecientes a otro grupo étnico-racial (5 de 10), sugiriendo un mayor sesgo de auto-percepción entre los descendientes de indígenas. Finalmente, cabe considerar que los haplogrupos mitocondriales solo dan cuenta de la herencia por vía maternal, y por lo tanto, puede discrepar con la auto-percepción que es influenciada por ambas vías parentales.

Conclusiones

La muestra de 100 individuos no fue representativa de la población de la Ciudad de Rivera ya que muchos de los participantes y/o sus ancestros son oriundos de otras partes del país. Los participantes se auto-identificaron como afrodescendiente 16%, indígena 14%, europeo 28%, asiático 2%, y 1% musulmán. La alta frecuencia de participantes que se autoidentificaron como afrodescendientes e indígenas se corresponde con lo encontrado en estudios y censos previos realizados en poblaciones de la región noreste.

Varias de las muestras revelaron una baja concentración de ADN y un bajo nivel de pureza. Es posible que el congelamiento de las muestras, y tal vez los protocolos de extracción de ADN, pudieron causar una baja sensibilidad de las técnicas de diagnóstico genético utilizadas. La ausencia de portadores de los alelos de interés HbS y $-\alpha^{3,7}$ pudo deberse al pequeño tamaño de muestra (N=100). Además, aunque la incidencia de estos polimorfismos es mayor en la población afrodescendiente (10 y 15%, respectivamente), este estudio sólo incluyó un 16% de participantes afrodescendientes.

Se encontraron los haplogrupos mitocondriales H, J, R y U, característicos de poblaciones europeas, el haplogrupo L, característico de poblaciones africanas, y los haplogrupos A, B, C, y D, asociados a las poblaciones indígenas o amerindias. Los haplogrupos indígenas de mayor frecuencia fueron el A2 y el C1. Las comparaciones con estudios previos indican que existe variación en la prevalencia de haplogrupos indígenas en diferentes zonas del país. La prueba estadística de chi-cuadrado reveló que no hay asociación significativa entre los haplogrupos mitocondriales y la autopercepción en nuestra submuestra de 31 individuos. Este resultado es esperado cuando en general los individuos no se reconocen como pertenecientes al grupo étnico-racial determinado por su linaje genético.

Bibliografía

Balgir RS (2007) Infant mortality and reproductive wastage in association to different genotypes of haemoglobinopathies in Orissa, India. Annals of Human Biology 34:16-25.

Bonilla C, Bertoni B, Gonzalez Cardoso H, Brum-Zorrilla N & Sans M (2004) Substantial native american female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. American Journal of Human Biology 16:289-297.

Cabella W, Nathan M & Tenenbaum M (2013) Atlas Sociodemográfico y de la Desigualdad del Uruguay. Fascículo 2: La población afro-uruguaya en el Censo 2011. Montevideo**,** Uruguay. TRILCE.

Castro de Guerra D, Figuera C, Izaguirre MH, Rodríguez-Larralde A, Guerra E, Martínez D & Pujo F (2009) Diversidad mitochondrial en el noroccidente de Venezuela. Implicaciones para probables rutas migratorias prehispánicas. Acta Biológica de Colombia 1:173-184.

Chong SS, Boehm CD, Higgs DR & Cutting GR (2000) Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α-thalassemia. Blood 95:360-362.

Clark BE & Thein SL (2004) Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clinical & Laboratory Haematology 26:159-176.

Da Luz J, Ávila A, Icasuriaga S, Góngora M, Castillo L, Serrón A, Miyuki Kimuram E, Ferreira Costa F, Sans M & Sonati M de F (2013) Frequency and spectrum of hemoglobinopathy mutations in a Uruguayan pediatric population. Genetics & Molecular Biology 36:316-322.

da Luz J.A, Sans M, Kimura E.M, Martins Albuquerque D, Sonati M & Ferreira Costa F (2006) α-thalassemia, HbS, and β-globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguay. Genetics & Molecular Biology 29:4.

Organización Mundial de la Salud (2006) 59ª Asamblea Mundial de la Salud, Informe de Secretaría, A59/9, punto 11.4 del orden del día provisional 24 de abril de 2006.

Fernández E (2005) Polimorfismos de DNA mitocondrial en Poblaciones Antiguas de las Cuenca Mediterráneo. Tesis de Doctorado en Biología, Universidad de Barcelona.

Figueiro G (2006) Estudio de las características y la continuidad de la población prehistórica de Arroyo Seco, Argentina, a través del ADN mitocondrial. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad de la República, Facultad de Ciencias: PEDECIBA, Uruguay.

Gascue C, Mimbacas A, Sans M, Gallino J. P, Bertoni B, Hidalgo & Cardoso H (2005) Frequencies of the four major amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay. Human Biology 77:873-878.

Gladwin MT (2010) Sickle cell disease. Lancet 376 (9757):2018-2031.

Instituto Nacional de Estadística (1998) Encuesta Continua de Hogares - Módulo Raza: Principales Resultados. División de Estadísticas Sociodemográficas, Departamento de Encuesta de Hogares. Disponible en: http://www.ine.gub.uy/etnico-racial

Klug WS & Cummings MR (1999) Conceptos de Genética, 5ta edición. Prentice Hall. Iberia, S.R.L., Madrid.

Klug WS, Cummings MR & Spencer CA (2006) Conceptos de Genética, 8va edición. Pearson, Prentice Hall. Madrid.

Little S (1998) Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. En: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidaman JG & Smith DR (eds.). Current Protocols in Human Genetics, Chapter 9: Unit 9.8. Wiley, New York.

Marengo-Rowe AJ (1965) Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. Journal of Clinical Pathology 18:790-792.

Martínez M, Lucrecia V, Bravi CM, Lahitte HB & Bianchi NO (1999) Estudio del ADN mitocondrial de una muestra de la ciudad de la Plata. Revista Argentina de Antropología Biológica 2:281-300.

Montoya J (2005) Biogénesis y patología mitocondrial. Revista de la Real Academia de Ciencias, Zaragoza 60:7:28.

Morelli L, Grosso M, Vona G, Varesi L, Torroni A & Francalacci P (2000) Frequency distribution of mitocondrial DNA haplogroups in Corsica and Sardinia. Human Biology 72:585-596.

Ou CN & Rognerud CL (1993) Rapid analysis of hemoglobin variants by cation-exchange HPLC. Clinical Chemistry 39:820-824.

Martín MR, Duany E, Dominguez M, Alfonso K, Santana MI & Viñales MI (2008) Anemia Falciforme: Conocimientos y percepción actual de riesgo en jóvenes detectados al nacimiento como portadores sanos. Revista Cubana de Genética Comunitaria 2(3):44-51.

Pawloski JR, Hess DT & Stamler JS (2005) Impaired vasodilation by red blood cells in sickle cell disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 102(7):2531-2536.

Pereira L, Macaulay V, Torroni A. Scozzari R, Prata M & Amorin A (2001) Prehistoric and historic traces in the mtDNA of Mozambique: insights into the Bantu expansions and the slave trade. Annals of Human Genetics 65:439-452.

Pereira Dos Santos C (2005) Estudio Genético y Biodemográfico del Archipiélago de las Azores (Portugal). Tesis de Doctorado. Universitat Autónoma de Barcelona. Unitat d' Antropologia Biológica. Departamento de Biologia Vegetal i ecología. Barcelona.

Postillona MB, Dejean CB & Avena SA (2009) Caracterización de haplogrupos mitocondriales europeos por RFLPs en cuatro poblaciones cosmopolitas de Argentina. IX Jornadas Nacionales de Antropología Biológica, Asociación de Antropología Biológica de la República Argentina, Puerto Madryn, Argentina.

Rees DC, Williams TN, Sans M, Salzano FM & Chakraborty R (1997) Historial genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. Human Biology 69:161-170.

Sans M (2009) Raza, Adscripción étnica y genética en Uruguay. RUNA XXX 163:174.

Sans M (2014) Continuidad indígena en el Uruguay: un linaje de 1610 años. Evolibro: La Enseñanza de la Evolución (Dutra Alburquerque A & Rojas Fleming A). Disponible en: www.evolibro.webnode.es

Sans M (2017) Identidad perdida: discordancias entre la identidad genética y la autoadscripción indígena en el Uruguay. Conversaciones del Cono Sur 3(1):17-22.

Sans M, Bertani B & Hidalgo P (2001) Estimación del número de indígenas en la región nordeste del Uruguay a partir de ADNmt**.** Revista Argentina de Antropología Biológica 3:2.

Sans M, Figueiro G, Hidalgo P (2012) A new mitochondrial C1 lineage from the prehistory of Uruguay: population genocide, ethnocide, and continuity. Human Biology 84:287-305.

Sans M, Mones P, Figueiro G, Barreto I, Motti JMB, Coble M D, Bravi CM & Hidalgo P (2015) The mitochondrial DNA history of a former native American village in northern Uruguay. American Journal of Human Biology 27(3):407-416.

Scheps KG, Francipane L, Nash A, Cerrone GE, Copelli SB & Varela V (2015) Bases moleculares de alfa: talasemia en la Argentina. Medicina, Buenos Aires, Argentina 75:81:86.

Schurr TG (2000) Mitochondrial DNA and the peopling of the New World. American Scientist 88:246-253.

Singh PJ, AC Shrivastava & AV Shrikhande (2015) Prenatal diagnosis of sickle cell disease by the technique of PCR. Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion 31:233:241.

Sociedad Brasileña de Patología Clínica Medicina Laboratorial (SBPCML) (2010) Recomendaciones de la Sociedad Brasileña de Patología Clínica Medicina Laboratorial para la Extracción de Sangre Venosa. 2da ed. Barueri, São Paulo: Minha Editora.

Tan AS, Quah TC, Low PS & Chong SS (2001) A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α: thalassemia. Blood 98:250-251.

Tavares GM, Reales G, Bortolini MC & Fagundes NJR (2019) Measuring the impact of European colonization on Native American populations in Southern Brazil and Uruguay: Evidence from mtDNA. American Journal of the Human Biology 31:e23243.

Yoshikawa, H, Dogruman-Al F, Turk S, Kustimur S, Balaban N & Sultan N (2011) Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples. Parasitol Research 109(4):1045-1050.

Anexo 1

Formulario de la encuesta realizada a los participantes de este estudio.

(1) Datos Personales	
Código	
Fecha / Lugar	
Nombre y Apellido	
Sexo	
Edad	
Dirección	
Teléfono/E-mail	
Lugar de Nacimiento	

(2) Origen Étnico del Participante	
Afro descendiente	
Europeo	
Indígena	
Asiático	
Otro	

(3) Origen Étnico de Padres	
Afro descendiente	
Europeo	
Indígena	
Asiático	
Otro	

(4) Origen Étnico de Abuelos	
Afro descendiente	
Europeo	
Indígena	
Asiático	
Otro	

(5) Anemia del participante	
Si	
No	
¿Cuándo? (Año)	
¿Tratamiento? (S/N)	

(6) Anemia en padres	
Si	
No	
¿Cuándo? (Año)	
¿Tratamiento? (S/N)	

(7) Anemia en abuelos	
Si	
No	
¿Cuándo? (Año)	
¿Tratamiento? (S/N)	

Anexo 2

Información sobre el lugar de nacimiento y autopercepción étnico-racial de cada participante. El participante 17 fue excluido del estudio y por ello hay un participante identificado como 101.

Individuo	Lugar de Nacimiento	Origen étnico-racial
1	Rivera	Europeo
3	Rivera	Indígena
5	Rivera	Europeo
6	Durazno	Asiático
11	Montevideo	Europeo
13	Rivera	Indígena
14	Livramento (Brasil)	Afro / indígena
15	Rivera	Afro
16	Rivera	Europeo
18	Livramento (Brasil)	Afro
19	Rivera	Indígena
21	San José	Europeo
22	Rivera	Indígena
24	Rivera	Indígena
27	Rivera	Europeo
28	Rivera	Indígena
29	Rivera	Europeo / indígena
31	Rivera	Afro
34	Rivera	No sabe
35	Rivera	Europeo
36	Rivera	Afro
37	Rivera	Asiático
38	Rivera	Europeo / indígena
39	Rivera	Afro
40	Rivera	Indígena
41	Montevideo	Otro
42	Montevideo	Europeo
44	Rivera	Desconoce
47	Rivera	Afro
48	Rivera	Europeo
49	Rivera	Afro
50	Livramento (Brasil)	Otro
51	Rivera	Otro
52	Rivera	Afro
53	Rivera	Europeo / indígena
54	Livramento (Brasil)	Desconoce
56	Canelones	No sabe
57	Rivera	Indígena
58	Rivera	Europeo

59	Paysandú	Afro
60	Rivera	No sabe
62	Rivera	Afro
63	Rivera	Europeo / indígena
64	Montevideo	No sabe
66	Rivera	Europeo / indígena
67	Rivera	No sabe
69	Rivera	No sabe
70	Rivera	Europeo
71	Rivera	No sabe
73	Rivera	No sabe
74	Montevideo	Europeo
75	Rivera	Europeo
76	Rivera	Europeo / indígena
77	Montevideo	Europeo / indígena
78	Rivera	Indígena
79	Rivera	No sabe
82	Rivera	Afro
83	Montevideo	Europeo
85	Rivera	Afro
86	Rivera	Europeo / indígena
87	Rivera	Afro / indígena
88	Rivera	Europeo / indígena
89	Rivera	Afro / indígena
90	Rivera	Afro
91	Rivera	No sabe
93	Rivera	Indígena
96	Rivera	Europeo
97	Rivera	Europeo / indígena
99	Rivera	Europeo
100	Rivera	Europeo / indígena
2	Caxias do Sul (Brasil)	Europeo
4	Rivera	Otro
7	Montevideo	Europeo
8	Tacuarembó	Afro
9	Montevideo	Otro
10	Tacuarembó	Europeo
12	Rivera	Indígena
20	Rivera	Afro
23	Durazno	Europeo
25	Livramento (Brasil)	Europeo
26	Rivera	Asiático
30	Rivera	Europeo
32	Livramento (Brasil)	Otro / Musulmán
33	Rivera	Indígena
43	Rivera	Afro / europeo / indígena

45	Rivera	Otro
46	Rivera	Europeo
55	Rivera	Europeo
61	Rivera	Europeo / indígena
65	Rivera	Afro
68	Rivera	Europeo
72	Rivera	No sabe
80	Rivera	Indígena
81	Montevideo	Europeo
84	Rivera	Afro / indígena
92	Salto	Europeo
94	Rivera	Europeo / indígena
95	Rivera	Afro / europeo / indígena
98	Montevideo	Europeo
101	Rivera	Indígena

Anexo 3

Concentración y pureza del ADN genómico para cada muestra analizada. Las muestras que no tienen datos (x) no pudieron ser analizadas por diferentes razones (40, 42, 54, 70, 80). El participante 17 fue excluido del estudio y por ello hay un participante identificado como 101.

Muestra	Concentración (ug/ml)	Relación 260/280	Relación 260/230
1	10,363	12,030	1,694
2	0,374	0,257	0,050
3	14,027	3,238	1,853
4	13,720	2,744	2,730
5	10,266	1,668	0,227
6	11,844	1,529	0,052
7	7,744	1,730	0,537
8	17,644	2,023	:69,05
9	0,075	0,603	0,110
10	25,442	9,888	0,146
11	63,012	1,745	1,485
12	20,779	1,864	0,092
13	13,694	2,255	1,790
14	14,200	2,960	1,580
15	19,308	1,627	0,635
16	12,860	1,489	1,263
18	0,024	0,565	0,149
19	> 0,000	1,287	0,317
20	> 0,000	0,020	0,014
21	6,485	5,510	0,400

22	29,353	2,018	40,90
23	> 0.000	0,802	0,192
24	34,230	2,030	3,889
25	8,182	1,466	0,709
26	17,350	1,825	1,301
27	8,285	1,693	0,705
28	18,882	1,988	3,150
29	17,555	1,694	0,072
30	56,448	1,873	6,577
31	0,011	0,576	0,058
32	34,098	1,945	17,700
33	31,418	2,021	4,853
34	25,281	1,960	2,462
35	3,791	1,478	0,909
36	5,379	1,299	0,216
37	3,229	1,148	0,472
38	7,603	1,368	0,693
39	4,625	1,320	0,301
40	x	x	x
41	6,350	1,341	1,185
42	x	x	x
43	9,227	2,153	0,378
44	2,172	22,540	0,650
45	14,960	2,701	3,080
46	4,304	1,392	0,285
47	6,811	1,386	0,869
48	27,125	1,655	2,239
49	> 0.000	9,228	0,640
50	17,808	1,609	5,249
51	35,478	1,733	2,520
52	4,201	1,177	0,868
53	12,716	1,446	1,307
54	x	x	x
55	10,782	2,364	0,409
56	6,248	1,290	0,222
57	13,860	1,589	0,581
58	37,234	1,912	1,615
59	38,005	1,865	2,468
60	44,269	1,702	0,726
61	5,706	1,442	0,377
62	14,053	1,839	1,347
63	16,430	1,452	0,581
64	49,974	1,694	0,144
65	37,529	1,755	0,152
66	25,063	1,671	0,138
67	12,654	3,895	>0.000
68	12,621	1,735	0,076
69	27,490	1,775	1,014

70	x	x	x
71	6,523	>0.000	5,125
72	>0,000	0,347	0,004
73	36,081	1,722	0,163
74	13,881	2,314	2,044
75	13,091	1,532	0,541
76	5,725	1,374	0,273
77	5,446	1,369	0,187
78	20,606	2,294	3,194
79	19,268	2,352	11,130
80	x	x	x
81	3,730	>0.000	>0.000
82	13,321	2,610	0,930
83	11,940	1,597	0,098
84	21,052	2,224	2,644
85	16,316	1,530	0,089
86	7,759	1,614	1,757
87	44,342	7,671	0,233
88	8,787	3,038	>0.000
89	38,330	>0.000	0,026
90	30,092	2,16	3,483
91	12,043	1,428	0,379
92	31,515	1,620	1,042
93	23,325	2,310	52,83
94	34,342	2,192	3,953
95	22,442	2,599	4,512
96	49,798	2,007	2,695
97	19,785	2,419	16,400
98	14,497	1,616	0,076
99	21,762	1,641	0,900
100	33,557	3,321	0,137
101	22,110	2,195	3,928

Anexo 4

Concentración y pureza del ADN extraído de plasma y sangre entera en espectrofotómetro.

Muestra	Concentración (ug/ml)	Relación 260/280	Relación 260/230
011 (plasma)	63,012	1,745	1,483
064 (plasma)	49,974	1,694	0,144
030 (plasma)	56,448	1,873	6,577
062 (sangre entera)	14,053	1,839	1,347
063 (sangre entera)	16,430	1,452	0,581

Valores indicativos de pureza en muestras de ADN

Razón	Valor	Pureza
260/280	> 2,1	Contaminación con ARN
	1,8 – 2,0	ADN pureza óptima
	1,6 – 1,8	ADN pureza aceptable
	< 1,6	Presencia de componentes aromáticos
260/230	< 1,5	Contaminación con sales, carbohidratos y fenoles