



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología –Subárea Genética

Caracterización molecular de los grupos sanguíneos ABO, Diego y Duffy en la población del noreste del Uruguay.

Tesis para la obtención del título de Magister en Ciencias Biológicas

Ing. Agr. Lorena Luna Andrada

Orientador: Dr. Pedro C. Hidalgo

Co-orientador: Dra. Mónica Sans

Montevideo, abril 2023

Tesis para la obtención del título de Magíster en Ciencias Biológicas PEDECIBA Biología, subárea Genética

Título de la Tesis:

Caracterización molecular de los grupos sanguíneos ABO, Diego y Duffy en la población del noreste del Uruguay.

Autor:

Ing. Agr. Lorena Luna Andrada (lorena.luna @gmail.com)

Directores:

Dr. Pedro C. Hidalgo (Uruguay, Udelar, CENUR, sede Tacuarembó)

Dra. Mónica Sans (Uruguay, Udelar, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación)

Tribunal:

Dr. Sergio Avena (Argentina, UBA y Universidad Maimónides).

Dra. Valentina Colistro (Uruguay, Udelar, Facultad de Medicina)

Dr. Gonzalo Figueiro (Uruguay, Udelar, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación)

Fecha de la defensa: 21 de abril del 2023.

Palabras Clave: Grupo sanguíneo, ABO, Diego, Duffy, RFLPs, mestizaje, Uruguay.

Agradecimientos

Una investigación generalmente se caracteriza por ser un trabajo en equipo y esta no es la excepción. Me siento profundamente agradecida con todos los que participaron, porque de una forma u otra me hicieron sentir acompañada. Pero al ser mi tesis de maestría, dicho documento tiene mi propia impronta, de modo que si algún error u omisión encuentran en la escritura es mi responsabilidad.

En primer lugar a mis tutores es para mí un honor que me hayan aceptado como su estudiante, me hicieron sentir que caminaba con verdaderos titanes en el área.

Al Dr. Pedro C. Hidalgo, me faltan las palabras para agradecer su confianza, fue el quien me alentó a pesar de mi formación de Ingeniera agrónoma a formar parte de su equipo en el PDU de Diversidad de Genética Humana e incursionar en esta disciplina hasta entonces desconocida para mí.

A mi co-tutora la Dra. Mónica Sans, un ejemplo a seguir, mil gracias por la infinita paciencia y tener siempre la mejor disposición para que esta investigación saliera adelante.

A los integrantes del tribunal, Sergio Avena, Valentina Colistro y Gonzalo Figueiro por el tiempo dedicado y las valiosas correcciones realizadas.

A todas y cada una de las personas que participaron en el muestreo, a los donadores y muy especialmente a quienes colaboraron recolectando muestras, el Dr. Yasser Vega y los estudiantes de Licenciatura Humana: Mariana Chaves, Valentina Rodríguez, Marcos Vassallucci y Horacio Sole.

A la Mag. Patricia Mut quien se encargó de la logística y transporte de las muestras a las que se les realizó el análisis de Duffy Nulo; sin su colaboración una parte importante de mi maestría no podría haber sido terminada. También a Ángel Carracedo e Inés Quintela de la Universidad de Santiago de Compostela, España y CEGEN-FPGMX por el servicio de genotipado.

A la Dra. Teresa Faguaga que me suministro datos antiguos de donantes de sangre.

A todas aquellas personas, compañeros de trabajo, amigos y familia que pusieron su granito de arena sin siquiera darse cuenta. Pero sobre todo a mis padres (esos genios con escuela primaria) por su amor y apoyo incondicional en todo momento, la base de lo que hoy soy es sin lugar a dudas gracias a todo lo que han hecho por mí.

Finalmente pero no menos importante, agradecer a las instituciones que hicieron esta investigación posible, el PDU de diversidad de Genética Humana de la sede Tacuarembó del CENUR Noreste, el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) que financio el proyecto "Variabilidad genética humana en la región norte del Uruguay y aspectos microevolutivos subyacentes".

Muchas gracias!!

Resumen

El objetivo general de este estudio fue caracterizar la población actual de los departamentos de Tacuarembó y Rivera mediante análisis de las variantes moleculares de los sistemas sanguíneos ABO, Diego y Duffy y determinar su vinculación con la ancestría a partir del estudio de 200 muestras del noreste uruguayo.

Para el sistema ABO a nivel fenotípico en Rivera el grupo sanguíneo predominante fue el A con valores de 0,48, mientras que en Tacuarembó fue el O con 0,49; este departamento se caracterizó también por tener un menor porcentaje de los alelos A, B y O^2 que Rivera, pero mayor del alelo O y sus variantes O^1 y O^{1v} (predominante en poblaciones indígenas).

En el sistema Diego la presencia del alelo Di^*A fue mayor en el departamento de Rivera donde alcanza una frecuencia de 0,04, siendo está muy similar a la de las poblaciones asiáticas, mientras que en Tacuarembó fue de 0,027, manteniendo mayor similitud con los países vecinos de Argentina y el sur de Brasil.

En la muestra de Tacuarembó se determinó una frecuencia FY^*A de 0,44 y FY^{*ES} de 0,09 mientras que en Rivera fue de 0,49 y 0,04 respectivamente y a nivel fenotípico para ambas muestras $Fy(a+b+)$ fue predominante, seguido por los homocigotas $Fy(a-b+)$ y $Fy(a+b-)$.

Las diferencias entre ambos departamentos fueron estadísticamente no significativas, pero al analizarlas de forma individual se apreciaron sutiles diferencias; pero al compararlas con otras poblaciones mundiales en general, se encontraron más próximos a poblaciones europeas y americanas.

Al estimar la mezcla génica para el caso de Tacuarembó se obtuvieron resultados que siguen la misma tendencia que investigaciones previas. La población general presentó porcentajes de aporte de 66% europeo, 25% indígena y 9% africano. Se encontraron diferencias según prestador de salud, entre quienes se atendían en ASSE el componente europeo disminuyó a 55,6% y por consiguiente el indígena aumentó a 36,3% ya que el africano apenas varió (8,1%), mientras que en mutualista prevaleció ampliamente la ascendencia europea con 72,2%, aumentó la africana a 13,5% y la indígena disminuyó al mínimo encontrado con 14,3%.

En Rivera la población general obtuvo valores 64,2% europea, 32,1% indígena y 3,7% africana; contrariamente a lo que esperábamos en ASSE disminuyó la ancestría indígena y africana (24,2% y 2,9%) y en mutualista aumentó alcanzando valores de 39,8% y 6,25% respectivamente. Si bien no existen precedentes de ningún estudio previo para este

departamento los resultados fueron sorprendentes. Se esperaba un mayor aporte africano (de acuerdo procesos históricos locales y a la encuesta de autopercepción de la población) y un menor componente indígena en relación a Tacuarembó que según investigaciones previas presenta los máximos niveles de ascendencia indígena a nivel biparental y por línea materna del país.

El análisis de los sistemas sanguíneos ABO, Diego y Duffy en su conjunto demostraron ser una herramienta útil para el análisis de mezcla genética, reflejando precisión para determinar la contribución parental al *pool* genético de poblaciones trihíbridas como la de Uruguay.

Índice:

1	Introducción.....	1
1.1	Los departamentos de Tacuarembó y Rivera	3
1.2	Sangre	5
1.3	Grupo sanguíneo.....	6
1.3.1	Clasificación de los grupos sanguíneos según sus antígenos.....	7
1.3.2	Los grupos sanguíneos como marcadores genéticos.....	8
1.3.3	El Sistema sanguíneo ABO.....	9
1.3.3.1	Historia del sistema ABO.....	9
1.3.3.2	Aspectos genéticos del sistema ABO.....	10
1.3.3.3	Características Moleculares del sistema ABO.....	12
1.3.3.4	Distribución mundial del sistema ABO.....	14
1.3.4	El Sistema sanguíneo Diego.....	16
1.3.4.1	Historia del sistema Diego.....	16
1.3.4.2	Aspectos genéticos del sistema Diego.....	17
1.3.4.3	Características moleculares del sistema Diego.....	17
1.3.4.4	Distribución mundial del sistema Diego.....	19
1.3.5	El Sistema sanguíneo Duffy.....	20
1.3.5.1	Historia de sistema Duffy.....	20
1.3.5.2	Aspectos genéticos del sistema Duffy.....	21
1.3.5.3	Características moleculares del sistema Duffy.....	22
1.3.5.4	Distribución mundial.....	23
2	Objetivo.....	26
2.1	Objetivos específicos.....	26
3	Materiales y métodos.....	26
3.1	Muestreo	27
3.2	Extracción y purificación de DNA.....	28
3.3	Pureza e integridad del DNA.....	29
3.4	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y enzimas de restricción.....	29
3.4.1	Sistema ABO.....	30
3.4.2	Sistema Diego.....	32
3.4.3	Sistema Duffy.....	33
3.5	Análisis estadístico.....	34

4	Resultados.....	35
4.1	Análisis de laboratorio.....	35
4.1.1	Extracción de ADN.....	35
4.1.2	PCR-RFLP.....	36
4.1.2.1	Sistema ABO.....	36
4.1.2.2	Sistema Diego.....	37
4.1.2.3	Sistema Duffy.....	38
4.2	Frecuencias y equilibrio de Hardy-Weinberg (HW).....	39
4.2.1	Sistema ABO.....	39
4.2.2	Sistema Diego.....	41
4.2.3	Sistema Duffy.....	42
4.3	AMOVA.....	43
4.4	Distancias genéticas con otras poblaciones.....	44
4.4.1	Sistema ABO.....	44
4.4.2	Sistema Diego.....	47
4.4.3	Sistema Duffy.....	49
4.4.4	Distancia genética para los tres sistemas de estudio y sus poblaciones parentales según prestador de salud.....	52
4.5	Análisis de mezcla.....	53
5	Discusión.....	55
5.1	Sistema ABO.....	55
5.2	Sistema Diego.....	57
5.3	Sistema Duffy.....	58
5.4	Mezcla genética.....	59
5.4.1	Aporte genético, lugar de atención y nivel socioeconómico.....	61
6	Conclusión.....	63
7	Referencias Bibliográficas.....	65
8	Anexos.....	81

Índice de Figuras

Figura 1. Región de muestreo.....	3
Figura 2: Unión antígeno anticuerpo.....	7
Figura 3. Representación esquemática de la organización genómica del gen ABO.....	12
Figura 4. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) del gen SLC4A1.....	18
Figura 5. Mapea de frecuencia alélica DI*A del continente americano.....	20
Figura 6. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP s) del gen DARC.....	23
Figura N° 7. Mapas de distribución global de frecuencias alélicas del grupo sanguíneo Duffy.....	25
Figura 8. Flujo de trabajo.....	27
Figura 9. Electroforesis ADN en geles de agarosa al 1%.....	36
Figura 10. Electroforesis del sistema ABO en geles de agarosa al 3%.....	37
Figura 11. Electroforesis del sistema Diego en geles de poliacrilamida al 10%	38
Figura 12. Electroforesis del sistema Duffy en geles de agarosa al 3%	39
Figura 13. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para el sistema ABO en Tacuarembó.....	40
Figura 14. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para ABO en Rivera.....	41
Figura 15. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para el sistema Diego en los departamentos de Tacuarembó y Rivera.....	42
Figura 16. Frecuencias fenotípicas observadas y esperadas para el sistema Duffy en los departamentos de Tacuarembó y Rivera.....	43
Figura 17. Dendrograma UPGMA a partir de frecuencias poblacionales del sistema ABO.....	46
Figura 18. Valores de FST para el sistema ABO.....	47
Figura 19. Dendrograma UPGMA a partir de frecuencias poblacionales del sistema Diego.....	48
Figura 20. Valores de FST para el sistema Diego.....	49

Figura 21. Dendrograma UPGMA a partir de frecuencias poblacionales del sistema Duffy.....	51
Figura 22. Valores de FST para el sistema Duffy.....	51
Figura 23. PCoA y dendrograma para 50 muestras de Tacuarembó y 50 muestras de Rivera diferenciadas según prestador de salud.....	53
Figura 24. Porcentaje de mezcla génica obtenida para el departamento de Tacuarembó....	54
Figura 25. Porcentaje de mezcla génica obtenida para el departamento de Rivera.....	54

Índice de tablas

Tabla 1. Genotipos, antígenos y anticuerpos en relación a cada fenotipo ABO.....	11
Tabla 2. Variación en la secuencia de los principales alelos del sistema ABO.....	13
Tabla 3. Secuencia de los juegos de <i>primers</i> utilizados en ABO.....	30
Tabla 4. Ciclado establecido para cada uno de los <i>primers</i> ABO.....	30
Tabla 5. Polimorfismos de secuencia, longitudes de producto de PCR y RFLP para los diferentes alelos ABO.....	31
Tabla 6. Patrones de restricción de los genotipos ABO.....	31
Tabla 7. Secuencia de los juegos de <i>primers</i> utilizados en Diego.....	32
Tabla 8. Ciclado establecido para cada uno de los <i>primers</i> de Diego.....	33
Tabla 9. Secuencia de los juegos de <i>primers</i> utilizados en Duffy.....	34
Tabla 10. Ciclado establecido para cada uno de los <i>primers</i> de Duffy.....	34
Tabla 11. Número observado y esperado de genotipos ABO para cada población.....	40
Tabla 12. Cálculo de frecuencias fenotípicas y alélicas de Tacuarembó, Rivera y conjuntas (Noreste).....	41
Tabla 13. Heterogocidad.....	44
Tabla 14. Frecuencias alélicas poblacionales para el sistema ABO.....	45
Tabla 15. Frecuencias alélicas poblacionales para el sistema Diego.....	47
Tabla 16. Frecuencias alélicas poblacionales para el sistema Duffy.....	50

Tabla 17. Frecuencia de compilado de poblaciones parentales y de las poblaciones estudiadas según prestador de salud.....	52
Tabla 18. Frecuencias fenotípicas en diferentes periodos.....	55
Tabla 19. Estimación de los aportes poblacionales del Noreste, empleando distintos sistemas genéticos biparentales.....	60

1. Introducción

El estudio de los grupos sanguíneos tiene gran interés para los investigadores de múltiples disciplinas. Tienen importancia en las transfusiones sanguíneas, obstetricia, neonatología y en medicina legal, además de que se utilizan como marcadores genéticos en estudios poblacionales, siendo este último nuestro principal objetivo.

En el campo de la medicina transfusional, es importante el estudio y la determinación de los grupos sanguíneos ABO, Duffy y Diego en los donadores y en los pacientes que se someten a transfusiones o trasplantes, mientras que en el ámbito antropológico son considerados como marcadores de identidad poblacional (Arreygue, 2011).

La genética de poblaciones es quien se encarga de dilucidar el origen de la variabilidad genética, por medio del análisis de frecuencias fenotípicas, genotípicas y alélicas. Dicha variabilidad tiene su origen primario en las mutaciones, pero las frecuencias alélicas en un locus varían de una generación a otra debido a diversas fuerzas naturales tales como la selección natural, la deriva génica y el flujo génico (Herrera-Paz, 2013).

Los primeros estudios encontrados en Uruguay de relevancia por la cantidad de individuos investigados se refieren a las frecuencias fenotípicas del grupo sanguíneo ABO realizado por Caragna y colaboradores en 1950 en el que analizó la sangre de 11.704 dadores voluntarios, y los datos de A. Scaltritti con el análisis de 28.695 individuos (citado por Sans, 1991). Baraibar, B. (1961, en Sans, 1991), en una revisión bibliográfica, alcanzo un total de 72.130 determinaciones, mientras que Surraco, G., et al. (1986, en Sans, 1991) realizó un estudio en 68.068 individuos en el que incluyó la determinación de los fenotipos Rhesus negativo y positivo. Pero la aparente homogeneidad y característica asumida de ser una población de descendientes de europeos retrasó los estudios desde el punto de vista de la genética de poblaciones, ya que hasta la década de 1970 los análisis de sistemas sanguíneos llevaban a comparar la población uruguaya solamente con algunas europeas como la española e italiana (Oyhenart-Perera, 1976, citado por Sans et al., 2021).

Hasta aproximadamente mediados de la década de 1980, la identidad nacional se centraba en la ausencia de descendientes de indígenas (creencia apoyada fundamentalmente, en las campañas de genocidio ocurridas en la década de 1830 contra los charrúas) y la escasa proporción de afrodescendientes, siendo entonces recién hacia fines del siglo XX que se comenzaron los estudios que buscaban identificar las contribuciones genéticas de poblaciones de diverso origen a la población uruguaya a partir de la frecuencia de ciertos

rasgos y alelos (Sans, 2014).

En la década de 1990, los análisis de polimorfismos sanguíneos de herencia autosómica, junto a la aplicación de métodos que permitieron estimar los aportes genéticos de diverso origen geográfico (aplicables a poblaciones trihíbridas), lograron no sólo determinar la magnitud de estos aportes genéticos a la población uruguaya, sino también probar que existían diferencias regionales (Sans, 2009).

Los primeros datos de frecuencias alélicas para antígenos eritrocitarios en Uruguay se llevaron a cabo en la tesis de maestría y doctorado de Mónica Sans (Sans, 1991, 1994) a partir de técnicas serológicas. En su maestría para el caso de ABO se muestrearon 496 individuos (12,5% residía al norte del Río Negro), para ellos las frecuencias fueron de 0,237 para el alelo A, 0,062 para el B y 0,700 para el alelo O. En el caso de Duffy (82 individuos) 0,394 fueron FY*A, 0,515 FY*B y 0,091 FY*^{ES}, mientras que para el sistema Diego los 37 individuos muestreados fueron DI*B. Continuando su línea de investigación en su tesis de doctorado analizó la población del departamento de Tacuarembó (Hospital Regional), en este caso para el sistema ABO (A=0.172, B=0,090 y O=0,738), Duffy (FY*A=0,365, FY*B=0,517 y FY*^{ES}=0,090) y Diego (Di*B=0.992 y Di*A=0.008).

Con el advenimiento de nuevas técnicas y procedimientos en el campo de la biología molecular, se han abierto en genética humana nuevas líneas de investigación con interesantes proyecciones, como lo es la caracterización molecular de variantes alélicas de sistemas de grupos sanguíneos (Llop et al., 2006). Para el caso de ABO, el estudio más reciente en Uruguay es de Acosta (2015) quien analizó mediante la técnica de polimorfismos del largo de los fragmentos de restricción (RFLPs) una muestra de 50 individuos de Montevideo, obteniendo frecuencias alélicas de A=0,31, B=0,07, O¹=0,39, O^{1v}=0,22 y O²=0,01.

El presente estudio se realizó en la región noreste, en el departamento de Tacuarembó, ubicado en el centro norte de Uruguay y el departamento limítrofe de Rivera y enfocándose en los estudios de genética de poblaciones busca detectar y analizar la variabilidad que existe entre los individuos de ambas poblaciones. Desde este punto de vista, el estudio de las variantes alélicas de los sistemas ABO, Duffy y Diego presenta particular interés ya que Tacuarembó se diferencia genéticamente del resto del país, registrando los máximos niveles de ascendencia indígena a nivel biparental y por línea materna (Sans et al 1997; Bonilla et al, 2004). Para Rivera no se encontraron estudios precedentes.

1.1. Los departamentos de Tacuarembó y Rivera

Los departamentos de Tacuarembó y Rivera están situados en la región noreste de Uruguay conjuntamente con el departamento de Cerro Largo (Figura 1).

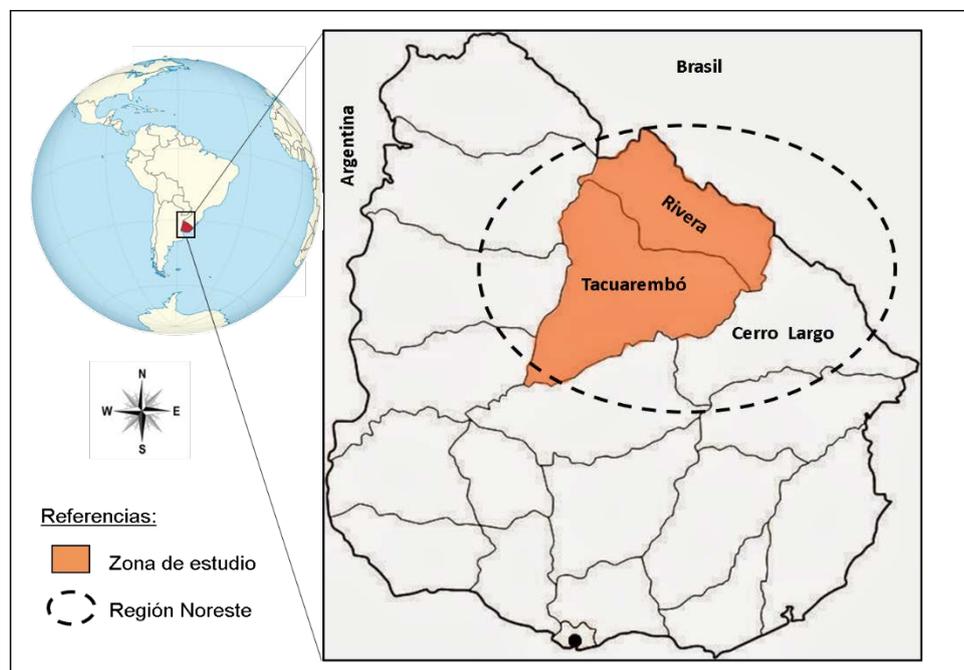


Figura 1. Región de muestreo. Mapa político de Uruguay indicando los departamentos de proveniencia de las muestras y la region noreste.

Tacuarembó es el departamento más extenso del Uruguay, creado por Ley del año 1837, cuando conjuntamente con Salto se segregó de Paysandú y a su vez hasta el año 1884 Tacuarembó comprendió el territorio hoy correspondiente al departamento de Rivera. Por su parte la ciudad de Tacuarembó se fundó en 1832, cuando el coronel Bernabé Rivera fundó la villa de “San Fructuoso” (Ramos et al., 1970). El proceso de fundación de Rivera es cuestionado, en 1862 se inicia jurídicamente el proceso fundacional y en 1867, se festeja el aniversario de la fundación solemne de la Villa, registrada en el acta (Olyntho et al., 1970).

La región de Tacuarembó estuvo habitada originalmente por diferentes etnias nativas (básicamente charrúas, minuanos y guaraníes), luego varias familias de ascendencia española e italiana se mudaron de Montevideo cuando se fundó la ciudad; sin embargo, la mayoría de sus pobladores eran de origen luso-brasileño y ocasionalmente esclavos que llegaban con estos o esclavos fugitivos de Brasil (Sans, 1994; Bonilla et al., 2004; Flores 2019). En Rivera el proceso fue similar, pero el hecho de que desde principios de la colonización americana, hacendados portugueses se hayan establecido en estos campos norteños, constituye el jalón inicial de un fenómeno sociocultural evidente: la enorme

influencia luso-brasileña en Rivera. Ellos se instalaron en estas tierras con un estatuto de dominio superior utilizando mano de obra esclava, y poblaron la mayor parte de los campos hasta finales del siglo XIX (Olyntho et al., 1970).

Según datos del Censo 2011, el departamento de Tacuarembó cuenta con una población de 90.051 habitantes. Es uno de los departamentos con mayor proporción de población en zonas rurales (10,7%) y la tasa de crecimiento de la población muestra cifras negativas en el último período intercensal (2004-2011). La población afrodescendiente (con ascendencia africana como principal) representa el 6,4% de sus residentes, mientras que la población que declara la ascendencia indígena como principal es del 5,7%, siendo Tacuarembó el departamento con mayor proporción de personas con esta ascendencia auto declarada (INE, 2011; Observatorio Territorio Uruguay, Tacuarembó, 2019). El departamento de Rivera cuenta con una población de 103.473, el 92,7% de la población es urbana y la tasa de crecimiento de la población al igual que Tacuarembó muestra cifras negativas en el último período intercensal, siendo el segundo departamento con mayor porcentaje de ascendencia africana declarada, lo cual representa el 12% de sus residentes (ascendencia principal), y donde 3,1% declararon ascendencia indígena como principal (INE, 2011, Observatorio Territorio Uruguay, Rivera, 2019).

Diferentes estudios han demostrado la diversidad genética en la población de Tacuarembó, donde se ha encontrado el máximo nivel de ancestralidad indígena a nivel biparental (Sans et al., 2014). Estudios genéticos con marcadores clásicos de grupo sanguíneos, proteínas y sistema de antígenos leucocitarios de histocompatibilidad (HLA) arrojaron un 65% de contribución europea, 15% africana y 20% indígena (Sans et al, 1997). A nivel uniparental por línea materna se estimó un aporte de 21% europeo, 17% africano y 62% nativo americano, ocupando el segundo lugar por detrás de Bella Unión (Bonilla et al., 2004), mientras que la contribución por vía paterna es primordialmente europea (95%) seguido de un 5% indígena (Bertoni et al., 2005). Los datos más recientes para Tacuarembó fueron aportados por Mut (2019), donde las proporciones de linajes maternos americanos, africanos y europeos fueron de 45%, 27% y 27% respectivamente (aunque para una muestra pequeña de 22 individuos) y los linajes paternos europeos fueron de 93,2% del total de haplogrupos observados y los indígenas y africanos de 3,4%, mientras que por medio de marcadores individuales de ascendencia (AIM) los resultados fueron 18,8% indígena, 11% africana, y 70,3% europea. Todos los estudios demuestran una evidente e importante diferencia en cuanto a las proporciones de los componentes ancestrales europeos,

americano nativo y africano entre ADNmt y cromosoma Y. El alto porcentaje en esta región de linajes mitocondriales indígenas y contribución paterna europea, se explica por la interacción direccional en las uniones preferenciales de mujeres indígenas o africanas con hombres europeos o descendientes de estos y la subsiguiente ausencia de migración de mujeres fuera de la región. Esto se apoya en el hecho de que, al menos hasta 1920, era mayor la tasa de hombres inmigrantes que llegaban a Tacuarembó que de mujeres (Sans, 1994; Flores, 2015).

Para el caso del departamento de Rivera no se cuenta con datos de ancestría disponibles a la fecha, por lo que esta investigación presentará los primeros datos que permitan caracterizar este departamento mediante marcadores moleculares biparentales.

1.2. Sangre

La sangre es un componente del cuerpo que funciona como medio de transporte, de regulación y de protección. Está conformada por plasma en un 55% y diversas células sanguíneas en un 45%. Estas células son los glóbulos rojos o eritrocitos, los cuales se encargan del transporte de gases; los glóbulos blancos o leucocitos, que cumplen la función de protección ante cuerpos extraños; y las plaquetas, que son fragmentos celulares esenciales para el proceso de coagulación. Por otro lado, el plasma está compuesto principalmente por agua, proteínas y otros solutos, tales como las hormonas y los electrolitos (Alvorado y Dubón, 2012).

Ha ocupado un lugar muy especial en la historia de la humanidad, ya que desde tiempos muy remotos se le ha otorgado una vital importancia. A pesar de ser un tejido de fácil acceso, resistió por muchas centurias a los esfuerzos de los investigadores por descubrir su verdadero significado fisiológico, siendo apenas en el siglo pasado que empezaron a entenderse sus procesos patológicos (Góngora-Biachi, 2005).

En el año 1818 James Blundell, obstetra y fisiólogo inglés hizo la primera transfusión de hombre a hombre y para 1875 ya se habían realizado unas 350 transfusiones en humanos. En 1899 Shattock informó sobre la aglutinación de eritrocitos de algunas personas con el suero de otras e interpretó este fenómeno como anormal. Pero fue Karl Landsteiner quién descubrió las diferencias de la sangre entre grupos de personas en 1901, dando inicio a la era inmunológica de la historia de la transfusión sanguínea (Grispan, 1983).

1.3. Grupos sanguíneos

Se denominan grupos sanguíneos a los tipos en los cuales se clasifica la sangre, determinados por un conjunto de antígenos específicos localizados en la membrana de proteínas, glicoproteínas o glicolípidos de los glóbulos rojos, los cuales son transmitidos por herencia de padres a hijos, siguiendo las leyes mendelianas de la genética y detectados por el uso de anticuerpos específicos (Reid, 2009; Daniels, 2002; Baltodano et al., 2014). Los eritrocitos que portan un determinado antígeno al ser introducidos en el torrente sanguíneo de un individuo que carece del mismo, pueden ocasionar una respuesta inmune (Reid, 2009). En otras palabras, el grupo sanguíneo es una clasificación de la compatibilidad entre los antígenos que se encuentran en la membrana eritrocitaria de un individuo y los anticuerpos que se encuentran en el plasma de un individuo distinto (Alvorado y Dubón, 2012).

Un antígeno (Ag) es toda sustancia que, cuando ingresa al organismo y es reconocida como extraña, es capaz de provocar una respuesta en el sistema inmune. Prácticamente cualquier tipo de molécula biológica como azúcares, lípidos, hormonas, metabolitos intermediarios, carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas pueden ser antígenos (Sandoval, 2014). Asimismo, un anticuerpo es una proteína con capacidad para reconocer y asociarse a ligandos específicos (Alvorado y Dubón, 2012). Todos los anticuerpos son inmunoglobulinas cuyas características fundamentales como proteínas fijadoras de antígenos son la especificidad de cada una de ellas para una estructura antigénica particular y su diversidad como grupo (Sandoval, 2014). A continuación en la Figura 2 se presenta la unión antígeno anticuerpo.

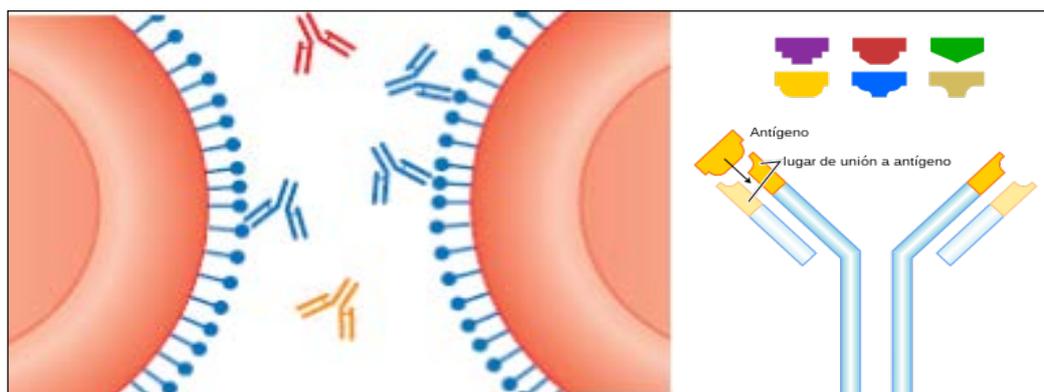


Figura 2. Unión antígeno anticuerpo. A pesar de tener un gran número de anticuerpos circulantes en sangre, estos sólo se unen a su antígeno específico. Modificado de Daniels y Bromilow, 2007 y Wikipedia (<https://es.wikipedia.org/wiki/Ant%C3%ADgeno>).

Según la Sociedad Internacional de la Transfusión Sanguínea (ISBT) la mayoría de los polimorfismos de grupo sanguíneo son el resultado de mutaciones de un solo nucleótido (SNP), que codifican sustituciones de aminoácidos en una glucosiltransferasa o en un dominio extracelular de una proteína de membrana de glóbulos rojos.

1.3.1. Clasificación de los grupos sanguíneos según sus antígenos

En la actualidad, se han reconocido más de 600 antígenos eritrocitarios, muchos de ellos dispersos en 43 sistemas de grupos sanguíneos diferentes (ISBT, 2022). Esta elevada cifra que aumenta año a año, creó la necesidad de establecer una clasificación o nomenclatura estandarizada. En 1980 fue creado el Comité para la Terminología de los Antígenos de Superficie del Glóbulo Rojo, de la ISBT. La clasificación postulada por dicho comité describe que cada antígeno aceptado es denominado con un nombre y un símbolo, creando así una nomenclatura de base genética que permita la denominación unificada de los antígenos eritrocitarios (López, 1992).

Se establecen tres categorías para la clasificación de los antígenos eritrocitarios:

Sistemas:

Se agrupan en sistemas todos los antígenos que son codificados por un solo gen o por complejos de dos o más genes homólogos estrechamente ligados y tan próximos entre sí que la posibilidad de recombinación entre ambos es remota (López, 1992). Un ejemplo de esto son los grupos sanguíneos ABO, Rh, Duffy, Diego, MNS y otros (ver anexo 1).

Según la ISBT, en el año 2009 se encontraban listados 29 sistemas sanguíneos frente a los 36 descritos en el año 2019 y los 43 definidos en la actualidad. Algunos de los sistemas sanguíneos actuales se encontraban en las colecciones, por lo que es previsible que en los próximos años algunos de los grupos sanguíneos que figuran en series o colecciones acaben constituyendo sus propios sistemas.

Colecciones:

Las colecciones se diseñaron para agrupar antígenos relacionados entre sí, ya sea bioquímica o serológicamente, pero aún no se ha descubierto su base genética ni cumplen los requisitos para ser agrupados dentro de los sistemas. Por ejemplo los antígenos Cs^a y Cs^b de la colección COST, o los antígenos Er^a , Er^b y Er^3 de la colección Er (López, 1992; ISBT, 2022).

Series:

Las series son antígenos que no pueden englobarse en un sistema ni en una colección, la serie 700 engloba antígenos de baja incidencia (<1%) en todas las poblaciones humanas, por ejemplo los grupos Batty, Christiansen y Biles y la serie 901 contiene antígenos que tienen una frecuencia >99 % en poblaciones de diferente ascendencia étnica, como por ejemplo Antó.

1.3.2. Los grupos sanguíneos como marcadores genéticos

Los antígenos han sido caracterizados tradicionalmente por técnicas serológicas, en las que se los enfrenta con su respectivo anticuerpo detectándose aglutinación a simple vista.

Si bien el fenotipado es fundamental para la confirmación de la presencia de anticuerpos y también para la detección de antígenos de grupos sanguíneos, el análisis de fenotipos tiene ciertas limitaciones técnicas debido a que el panel de muchos anticuerpos no está disponible comercialmente y requiere mucha mano de obra, por lo que se puede tipificar un número relativamente pequeño de donantes para un número relativamente pequeño de antígenos (Höher et al., 2018).

Otra desventaja de estos análisis es que no permiten discriminar genotipos heterocigotas en los que se da dominancia, como por ejemplo en el sistema ABO, donde AO o BO no difieren serológicamente de los homocigotas AA o BB. Por su parte la tipificación molecular de grupos sanguíneos tiene un enfoque completamente diferente, ya que investiga la información genética en el ADN del donante o paciente basándose en los genes que codifican los alelos del grupo sanguíneo, lo que desde el punto de vista de la genética de poblaciones tiene gran importancia (Malomgré y Neumeister, 2008; Vaccaro, 2017).

Las principales indicaciones para realizar este tipo de prueba molecular en inmunohematología son la identificación de antígenos eritrocitarios en pacientes recién transfundidos, en pacientes con prueba de antiglobulina directa positiva y en situaciones en las que existe riesgo de desarrollar enfermedad hemolítica del feto y recién nacido, así como también para identificar la presencia de variación en genes que codifican antígenos que se expresan débilmente en la membrana, contribuyendo así a la prevención de posibles reacciones transfusionales (Höher et al., 2018). En estas situaciones, el genotipado de grupos sanguíneos ha demostrado ser una excelente alternativa.

Los grupos sanguíneos cumplen con las condiciones necesarias para ser utilizados como

marcadores genéticos biparentales. Tienen una herencia mendeliana (salvo el genotipo AB-cis), permanecen inmutables durante toda la vida del individuo (a excepción de ciertas patologías) y su expresión es independiente del ambiente, presentando una gran variedad de polimorfismos, algunos de los cuales se distribuyen de manera diferencial en las distintas poblaciones. Estas características determinan que constituyan una herramienta antropológica de suma importancia en los estudios genéticos poblacionales (Avena, 2003 citado por Vaccaro, 2017).

1.3.3. El sistema sanguíneo ABO

Fue el primero de los sistemas de grupos sanguíneos descubiertos (por lo que se le asignó el número 001 según la ISBT) y es el más importante para la transfusión de sangre y trasplantes.

1.3.3.1. Historia del sistema ABO

En 1900 Karl Landsteiner analizó la sangre de un total de 6 personas, la de cinco colaboradores de su laboratorio y la suya propia, observando que el suero de ninguno de los seis individuos reaccionó con las células propias y que al mezclar la sangre de dos personas había ocasiones en que los glóbulos rojos se aglutinaban formando grumos visibles. Pero fue en 1901 que publicó un artículo en el que tabuló los resultados de las pruebas cruzadas de los sueros y describió los tipos A, B, y O de los hematíes (Owen, 2000). Dos años más tarde, dos discípulos suyos, Alfredo de Castello y Adriano Sturli, analizando 155 muestras, descubren un cuarto grupo, al que llamaron AB (Mazana, 2001).

Así la medicina transfusional inició su verdadera etapa científica y el sistema ABO se convirtió en el sistema sanguíneo más importante mundialmente, ya que hasta entonces toda la sangre se consideraba igual en todas las personas y no se entendía las consecuencias a menudo trágicas de las transfusiones (Arbeláez-García, 2009).

El grupo sanguíneo ABO se utilizó por primera vez con fines antropológicos en 1919, cuando Hirszfild y Hirszfild describieron la variación hallada en las frecuencias para los grupos A y B del sistema ABO entre los batallones de diferentes nacionalidades que combatieron en la Primera Guerra Mundial, determinando diferencias en la distribución a nivel poblacional de los alelos (Avena, 2003 citado por Vaccaro, 2017).

Los primeros estudios genéticos para abordar preguntas sobre la historia de las poblaciones humanas se realizaron utilizando marcadores clásicos como el sistema ABO (Cavalli-Sforza

et al., 1995).

Para la población uruguaya los tres primeros análisis del sistema ABO relevantes, por la cantidad de individuos investigados, fueron el de Caragna, Scaltritti y Baraibar entre 1950 y 1961 (Sans, 1991). Pero hasta la década de 1970 dichos análisis llevaban a comparar la población uruguaya solamente con algunas europeas ya que no se asumía mezcla genética (Oyhenart-Perera, 1976, citado por Sans et al., 2021).

A nivel molecular, los trabajos de Yamamoto et al. (1990) y Hummel et al. (2002) permitieron una mejor resolución de la nomenclatura de los alelos moleculares del sistema ABO (Acosta, 2015). A partir de estos trabajos se han desarrollado numerosos métodos para el genotipado de ABO a partir de ADN genómico. Estos implican principalmente análisis de enzimas de restricción de productos de PCR o PCR con cebadores aleloespecíficos entre otras (Daniels y Bromilow 2007). Pero con el desarrollo de nuevas tecnologías la secuenciación se ha convertido en una interesante alternativa que permite identificar y caracterizar nuevas variantes alélicas de muy baja incidencia en la población. Según Lang y colaboradores (2016) se informaron 367 alelos ABO en la Base de Datos de Mutaciones Genéticas en Antígenos de Sistemas de Grupo Sanguíneos (BGMUT), 95 alelos más que en 2010. A su vez en ISBT se describen en detalle 84 variantes A, 48 B, 12 AB y 43 O.

1.3.3.2. Aspectos genéticos del sistema ABO

El sistema de grupo sanguíneo ABO ha sido ampliamente utilizado en la caracterización de distintas poblaciones. Diversos trabajos así lo demuestran, pero la mayor parte han sido llevados a cabo principalmente por medio de técnicas serológicas de aglutinación. Dicho enfoque, aunque adecuado en términos generales, presenta el gran inconveniente de no poder discriminar entre estados de homocigosis y heterocigosis en los individuos fenotípicamente clasificados como A o B y la relación de éstos con respecto a individuos de grupo O (Henríquez et al., 2004).

El grupo sanguíneo ABO está controlado por un gen del mismo nombre, ubicado en el cromosoma 9 que codifica tres alelos, alelo A, alelo B y alelo O, para cuatro fenotipos (A, B, AB y O). El alelo A y el B son dominantes respecto al O que es recesivo. Por ejemplo, una persona con sangre de tipo A puede ser AA o AO, lo mismo ocurre con las personas de sangre tipo B. Los alelos A y B son codominantes, es decir que si una persona lleva estos dos alelos tendrá el grupo sanguíneo AB y para ser del grupo O ambos alelos tienen que

serlo (Daniels y Bromilow, 2007; Vaccaro, 2017). Ver Tabla 1.

FENOTIPO	GENOTIPO	Antígenos en eritrocitos	Anticuerpos en suero
A	AA/AO	A	Anti-B
B	BB/BO	B	Anti-A
AB	AB	A y B	Ninguno
O	OO	Ninguno	Anti-a y Anti-B

Tabla 1. Genotipos, antígenos y anticuerpos en relación a cada fenotipo ABO.

Este grupo consiste en tres antígenos: A, B y H, y el tipo de sangre de una persona depende de la presencia o ausencia de dichos antígenos ubicados en las membranas celulares de los eritrocitos o glóbulos rojos. Los individuos del grupo A, tienen el antígeno A en la membrana de sus glóbulos rojos y su plasma posee anticuerpos anti B; el que pertenece al grupo B, tiene el antígeno B y su plasma posee anticuerpos anti A, los del grupo AB tienen los dos antígenos y no presentan anticuerpos, mientras que los del grupo O carecen de ambos antígenos pero tiene anticuerpos contra ambos (Tortora, 2004, citado por Baltodano et al., 2014). Esto se puede observar en la Tabla 1.

Sin embargo los genes del grupo sanguíneo ABO no codifican directamente sus antígenos específicos, sino que producen enzimas glucosiltransferasas que transfieren azúcares específicos, a cadenas precursoras de carbohidratos (Sandoval, 2014). El antígeno H se origina a partir de la enzima glicosiltransferasa α -2-L-fucosiltransferasa que dona el azúcar GDP-fuc y el azúcar inmunodominante es la L-fucosa. El antígeno A con la glicosiltransferasa α -3-N-galactosaminiltransferasa, siendo el azúcar donado el UDP-Gal NAc y el azúcar inmunodominante, el N-acetil-galactosamina, mientras que el antígeno B se origina con la enzima α -3-d-galactosiltransferasa, el azúcar donado es UDP-Gal y como azúcar inmunodominante la D-Galactosa (Yoshida, 1982; Sandoval,2014).

El antígeno H es sintetizado por una glicosiltrasferasa producida por el gen FUT1 ubica en el cromosoma 19 que es independiente a los genes ABO, ubicados en el cromosoma 9, pero actúa como el sustrato aceptor de la glicosiltransferasas específicas del gen A y B (Daniels; 2002). Los individuos que poseen el fenotipo Bombay no heredan el gen H y no son capaces de producir la sustancia H por lo que no pueden producir ni el antígeno A ni el antígeno B. Los eritrocitos son aparentemente como los del fenotipo O, pero carecen de sustancia H. Para que se produzca antígeno H, debe existir al menos una copia funcional del gen H (H/H

o H/h); si ambas copias del gen son inactivas (h/h) se produce el fenotipo Bombay (Arbeláez-García, 2009), pero esto es sumamente extraño por lo que se conoce como “la sangre dorada”.

1.3.3.3. Características Moleculares del sistema ABO

El gen ABO está localizado en la parte distal del brazo largo del cromosoma 9, posición 9q34.1-q34.2 y abarca más de 18 kilobases (Seltsam et al., 2003).

Se compone de 7 exones, que varían en tamaño de 28 a 688 pares de bases (pb), y 6 intrones con 554 a 12982 pb (Figura 3). Los últimos 2 exones (6 y 7), codifican 77 % de la región codificante completa y 91% de la proteína transferasa soluble catalíticamente activa (Yip, 2002).

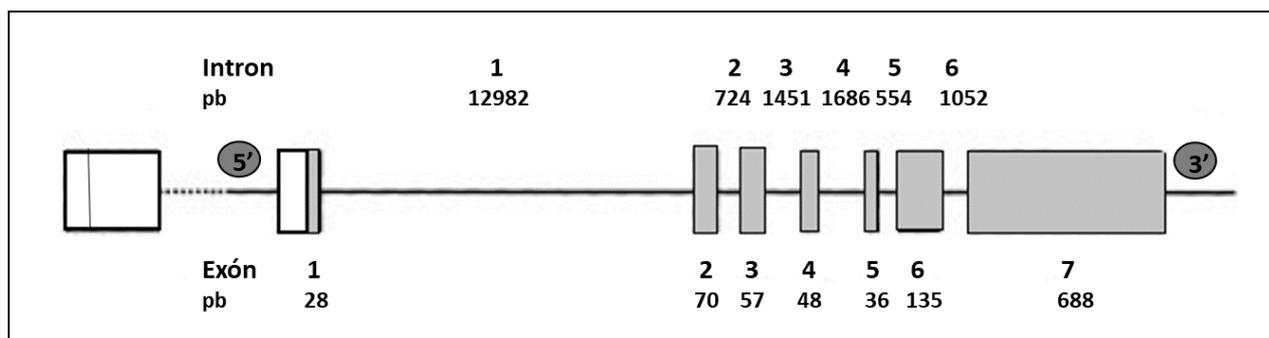


Figura 3. Representación esquemática de la organización genómica del gen ABO. Se muestran los números de nucleótidos en los exones e intrones. Modificado de (Seltsam et al., 2003).

En cuanto a la nomenclatura para la identificación de las variables alélicas hasta el momento no existe una terminología consensuada para todos los alelos identificados y continuamente se informan nuevos alelos en la literatura, cuyos autores suelen nombrar a su manera. Si bien de modo general, según la ISBT, lo más correcto es colocar el grupo sanguíneo, un asterisco y luego la variable alélica, también son aceptados nombres alternativos.

Los 6 alelos ABO comunes en individuos europeos son ABO*A1.01, ABO*A2.01, ABO*B.01, ABO*O.01.01, ABO*O.01.02, ABO*O.02.01, pero para simplificar de aquí en adelante se usaran nombres alternativos para las variables estudiadas, O¹ (también conocido como O01), O^{1v} (O02) y O² (O03), y para A y B se empleara el fenotipo. En la Tabla 2 se muestran las principales variaciones en la secuencia con la nomenclatura empleada de aquí en más.

La base molecular de ABO se determinó mediante la clonación y secuenciación de ADNc para el alelo A¹ (ABO*A1.01) por lo que este generalmente se usa como la referencia contra la cual se comparan todos los demás alelos (Yip, 2002).

Los alelos A y B principales difieren en siete sustituciones de una sola base dentro de la secuencia de codificación en 297, 526, 657, 703, 796, 803 y 930 (Yip, 2002), cuatro de los cuales son responsables de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 176, 235, 266 y 268 (Daniels y Bromilow, 2007).

Se han descrito diferentes alelos O, en varias poblaciones, los dos más frecuentes corresponden a O¹ y O^{1v} variante (O^{1v}). El alelo O¹ es el alelo de referencia, en tanto el O^{1v}, además de presentar la mutación que define a los alelos O, exhibe otras 9 sustituciones nucleotídicas a lo largo de su secuencia (Llop et al., 2006). Las mutaciones en el exón 6 y 7 se observan en la Tabla 2, las otras 4 sustituciones se dan en el exón 3 posición 106 donde se sustituye una G por una T, en el exón 4 (188 G→A, 189 C→T) y exón 5 (220 C→T) (Olsson et al., 1997).

El alelo O¹ difiere de los alelos A y B, en una mutación en el exón 6 de la secuencia del gen ABO, que corresponde a una delección de un nucleótido G (guanina), en la posición 261 (G261). Esta mutación, que genera un cambio en el marco de lectura da como resultado una proteína truncada (117 aminoácidos) que es enzimáticamente inactiva y es característica de la gran mayoría de los alelos O descritos hasta ahora (Olsson et al., 1996; Llop et al., 2006).

Exón	6		7													
	261	297	467	526	646	657	681	703	771	796	802	803	829	930	1060	1096
A ¹	G	A	C	C	T	C	G	G	C	C	G	G	G	G	C	G
B ¹		G		G		T		A		A		C		A		A
O ¹	Δ															
O ^{1v}	Δ	G			A		A		T				A			
O ²		G		G							A					A

Tabla 2. Variación en la secuencia de los principales alelos del sistema ABO. Se indica la posición de los alelos que varían, teniendo como referencia A¹. El símbolo Δ indica una delección. Modificado de Yip et al, 2006.

Existe una pequeña proporción de alelos O que no pueden ser definidos en base a la mutación presente en el nucleótido 261. De estas variantes, destaca el alelo O², el que presenta algunas mutaciones que generarían un cambio aminoacídico en un dominio clave

de la proteína (Llop et al., 2006). Si bien el producto O² tiene leucina en el codón 266 (típico de un A transferasa), la arginina en el codón 268 bloquea el acceso de la N-acetilgalactosamina a su sitio de unión en el centro activo de la enzima y por lo tanto no puede sintetizar ningún antígeno (Daniels, 2005; Vaccaro, 2017).

1.3.3.4. Distribución mundial del sistema ABO

Mediante la utilización de técnicas moleculares de tipificación del grupo sanguíneo ABO es posible definir características particulares de determinados grupos étnicos, y más aún, diferenciar dentro de ellos algunos subgrupos que los conforman, llegando de esta forma, a un conocimiento cabal del acervo genético de diversas poblaciones (Henríquez et al., 2004).

Según Daniels (2002) existe una clara diferenciación geográfica en cuanto a la distribución de las frecuencias alélicas. El alelo O tiene sus mayores valores (>0,7) en poblaciones aborígenes de América, Australia y partes de África, pero no en la mayor parte de Europa o Asia. Algunos nativos de América del Sur y Central son prácticamente todos del grupo O y probablemente lo eran completamente antes de la invasión europea. La frecuencia de A es bastante alta (0,25–0,55) en Europa, especialmente en partes de Europa Central pero también en ciertas tribus nativas americanas, donde la frecuencia alcanza 0,35. B está casi ausente en poblaciones de aborígenes de América, y probablemente estuvo ausente antes de la llegada de los europeos. Las más altas frecuencias de B se encuentran en Asia Central (0,2–0,3) y en Europa, disminuye de aproximadamente 0,15 en el este a menos de 0,05 en los Países Bajos, Francia, España y Portugal.

En el trabajo de Sans (1991), se comparan las frecuencias obtenidas para Uruguay (A=0,238, B=0,062 y O=0,700), con los datos de máxima y mínima obtenidos para las poblaciones parentales europeas (España, Portugal e Italia), africanas (África subsahariana) e indígenas de América del Sur. En europeos el alelo A alcanzó las máximas frecuencias reportadas, presentó máximas de 0,301 y mínimas de 0,225, en B se dieron máximas de 0,104 y mínimas de 0,013 y para el alelo O se obtuvieron frecuencias máximas de 0,745 y mínimas de 0,650. En africanos el alelo predominante fue el O alcanzando frecuencias máximas de 0,886 y mínimas de 0,664, seguido por el A (máximas=0,216 y mínimas=0,049), y el B (máximas=0,188 y mínimas=0,064). Mientras que las poblaciones indígenas se caracterizaron por presentar la máxima frecuencia para el alelo O con valores

entre 1 y 0.797 y las mínimas frecuencias para el alelo A y B con valores máximos de 0,203 y 0,102 respectivamente y mínimas de 0 en ambos casos.

En el artículo de Parolin y colaboradores (2013), se presentan frecuencias poblacionales parentales pero con diferenciaciones para las variantes O. En esta población europea posee frecuencias de 0,225 para el alelo A, 0,081 para el alelo B y en el alelo O, el más abundante fue O¹ con frecuencias de 0,432, seguido de O^{1v} con 0,223 y O² con 0,020. En la población africana A=0,156, B=0,142 y O=0,702, donde O¹ y O^{1v} presentaron frecuencias de 0,141 cada uno, no se encontraron variantes del alelo O² y un 0,420 se correspondió a otras variantes alélicas dentro del dicho grupo. Para la población indígena la frecuencia de O¹ fue de 0,270 y la de O^{1v} de 0,730 mientras que no se detectaron otros alelos.

De lo descrito anteriormente se puede observar que todos los principales alelos de ABO se encuentran en la mayoría de las poblaciones en todo el mundo, mientras que en la mayoría de los indígenas se encuentran casi exclusivamente alelos del grupo O. De ahí el interés de este trabajo por la caracterización molecular del alelo O, para ayudar a dilucidar las posibles causas del predominio del grupo O en la población uruguaya y su relación con la ascendencia indígena.

El alelo clásico (O¹) y el O^{1v}, por su gran variabilidad y elevada frecuencia mundial han sido los más intensamente estudiados, ya que se comparten entre todas las poblaciones de indígenas americanos prehistóricas y contemporáneas, así como también con las poblaciones del Viejo Mundo (citado por Villanea et al., 2013). Mientras que otras variantes alélicas del grupo O (como O^{1vG542A}) son exclusivas de indígenas y se ha demostrado que el alelo estaba presente en América antes del contacto con los europeos. (Villanea et al., 2013).

Para explicar la alta frecuencia del alelo O en amerindios, se han propuesto tres teorías. La primera es un “efecto fundador” que se habría producido durante el poblamiento inicial de América (sólo el alelo O estaría presente en la pequeña población fundadora). En segundo lugar la “selección natural” favoreciendo al fenotipo O para ciertas enfermedades en relación al A y B. En tercer lugar, el “cuello de botella” genético relacionado con la reducción del tamaño de la población como consecuencia del contacto con los europeos y la colonización que condujeron a un declive significativo de la población indígena (Estrada-Mena et al., 2010; citado por Vaccaro, 2017).

La relación de los grupos sanguíneos y diversas enfermedades, permite plantear la posibilidad de que las enfermedades hayan actuado como uno de los posibles agentes

selectivos que eliminó del *pool* génico de la mayor parte de las poblaciones americanas, el antígeno A, cuya existencia ha sido demostrada en momias precolombinas y restos óseos (Goicoechea, 1992).

1.3.4. El sistema sanguíneo Diego

1.3.4.1. Historia del sistema Diego

El antígeno Diego fue descubierto en 1953 por el hematólogo estadounidense Philip Levine (1900-1987) en una muestra de sangre enviada desde Venezuela por el pediatra Miguel Raga Mendoza. El *propositus*, de nombre Diego, había fallecido a los 3 días de edad por causa de una enfermedad hemolítica del recién nacido, razón por la cual Levine bautizó al nuevo antígeno con el nombre de Diego (Soyano y Müller, 2014).

Los eritrocitos del niño estaban intensamente sensibilizados con anticuerpos y los eritrocitos del padre produjeron una fuerte aglutinación cuando se enfrentaron con el suero de la madre (Arreygue-Avila, 2011). El anticuerpo anti-Dia no reaccionó cuando se lo analizó contra 2600 muestras de sangres al azar, pero sí estuvo presente en la sangre de 10 de los 33 miembros de la familia paterna examinados, por lo que Levine lo clasificó como un factor privado o familiar de baja prevalencia (Tatarsky et al., 1959, Trujillo, 2012).

En 1955, los hematólogos Miguel Layrisse y Tulio Arends llegaron a la conclusión de que el antígeno Diego tenía una mayor frecuencia que la reportada por Levine y que constituía un grupo sanguíneo de alta prevalencia en poblaciones indígenas venezolanas. Estos resultados fueron extendidos a otras poblaciones indígenas de América, demostrándose también su existencia en personas de origen asiático y su ausencia en poblaciones europeas y africanas, por lo que el factor sanguíneo se consideró de origen mongoloide (Tatarsky et al., 1959; Soyano y Müller, 2014). Estos primeros estudios realizados principalmente en grupos indígenas de población venezolana y caribeña encontraron una frecuencia del 35,54%, lo que puso en alerta a los países latinoamericanos de la existencia de un nuevo antígeno eritrocitario capaz de provocar ocasionalmente enfermedad hemolítica del recién nacido (Soyano y Müller 2014; Góngora et al., 2018).

En 1967, casi 15 años mas tarde del descubrimiento del antígeno Dia, Thompson, Childers y Hatcher identificaron el anticuerpo contra el segundo antígeno, Dib, en dos indígenas mexicanas, una de ellas con una reacción hemolítica postransfusional y la otra con pruebas cruzadas incompatibles (Arreygue-Avila, 2011).

1.3.4.2. Aspectos genéticos del sistema Diego

De acuerdo a la ISBT el sistema de grupo sanguíneo Diego fue el décimo en ser descrito por lo que su número es 010, su símbolo se representa como DI y en la actualidad se conocen 23 antígenos. Estos son NFLD, ELO, Fra, Rba, WARR, Vga, Wda, Wdb, BOW/NFLD, Wu, Jna,/KREP, Bpa, Swa/SW1, Hga/Moa, Wra/Wrb, Dia/Dib, DISK, de los que Dib y Wrb son de alta frecuencia, mientras que Dia y Wra y los 19 antígenos restantes son considerados de baja frecuencia, siendo Dia y Dib los principales involucrados en enfermedad hemolítica del recién nacido y en reacciones transfusionales (Daniels, 2002; Trujillo, 2012; Góngora, 2015).

Los anticuerpos anti-Dia pueden causar reacción hemolítica inmediata y enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN). Por el contrario, la presencia de los anti-Dib usualmente se asocian con una reacción transfusional mucho menor o tardía (Daniels, 2002; Arreygue-Avila, 2011).

Muchas veces la aloinmunización por antígenos eritrocitarios del sistema Diego pasa desapercibida, y no es hasta que se presenten reacciones transfusionales o hemólisis fatales en neonatos cuando se determina su existencia en estos pacientes, abriendo así la duda sobre qué porcentaje de la población se encuentra expuesta a estos antígenos de manera desconocida (Góngora et al., 2018).

Los avances moleculares permitieron determinar que el antígeno Diego forma parte de una proteína de la membrana de los eritrocitos conocida como banda 3 o AE1 que representa el 25% del total de proteínas eritrocitarias. Es por esta razón que hoy es uno de los antígenos que debe ser identificado en poblaciones con prevalencias altas (Geoff, 2013, citado por Góngora, 2015). La secuenciación del ADNc de la banda 3 confirmó que la proteína codifica 911 aminoácidos y consta de tres dominios: un dominio N terminal citoplásmico de 403 aminoácidos, un dominio transmembrana hidrofóbico de 479 aminoácidos, y una cola citoplasmática C-terminal de 29 aminoácidos (Tanner et al., 1988; Lux et al., 1989; Daniels, 2002).

1.3.4.3. Características moleculares del sistema Diego

El gen SLC4A1 (Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger Member 1) se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 en la banda 21 sub-banda 31, extendiéndose a lo largo de 18,43 kilobases. Consta de 19 intrones y 20 exones de los cuales 5 son los involucrados en la

codificación de variantes fenotípicas de los antígenos del sistema Diego, y codificando para la proteína de la banda 3 (Daniels, 2002; Arreygue-Avila, 2011; ISBT, 2022).

En cuanto a la nomenclatura, la ISBT describe 25 alelos diferentes, siendo los más relevantes DI^*A también nombrado DI^*01 y DI^*B también llamado DI^*02 (alelo de referencia), los cuales determinan los fenotipos $Di(a+b+)$, $Di(a+b-)$ y $Di(a-b+)$, seguido por los alelos $DI^*02.03$ y $DI^*02.04$ que determina los fenotipos $Wr(a+b+)$, $Wr(a+b-)$ y $Wr(a-b+)$.

Bruce y colaboradores (1994) demostraron que la base molecular de los alelos DI^*A y DI^*B , es una única sustitución de aminoácidos de leucina por prolina en la posición 854 de la proteína de la banda 3. Dicha sustitución se corresponde con el nucleótido 2561 donde para DI^*A se encuentra una timina y para DI^*B una citosina (Daniels, 2002; ISBT, 2022).

Para el otro par de alelos importante del sistema Diego, $DI^*02.03$ y $DI^*02.04$, se sustituye adenina en la posición 1972 por guanina que producen el cambio del aminoácido lisina por ácido glutámico (Daniels, 2002; Arreygue-Avila, 2011; ISBT, 2022). En la Figura 4 se puede observar lo descrito anteriormente.

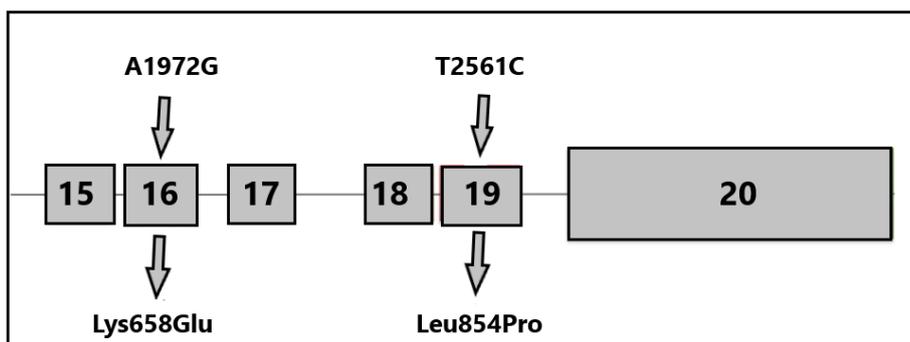


Figura 4. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) del gen SLC4A1. Se esquematizan los sitios donde ocurren los cambios que originan los principales antígenos del grupo sanguíneo Diego. Modificado de Arreygue-Avila, 2011.

Los otros antígenos Diego de baja frecuencia están asociados a una sustitución simple de aminoácidos en la banda 3. Hasta el momento no se ha reportado en individuos sanos el fenotipo Diego nulo lo cual indica la importancia funcional de la banda 3 (Trujillo, 2012). La denominación del antígeno Diego nulo se debe al reporte de un caso en el que se evidenció la completa ausencia de la banda 3 en los eritrocitos del paciente, por lo que se consideró un antígeno Diego (a-b-). Además se han evidenciado antígenos del sistema Diego en la banda 3 de glóbulos rojos anormales implicados en procesos de adhesión principalmente

por contagio de malaria. (Trujillo, 2012; Góngora, 2015).

1.3.4.4. Distribución mundial del sistema Diego

Los estudios de frecuencia en DI*A son conocidos por su utilidad como marcador antropológico. Desde 1955, numerosos estudios de indígenas sudamericanos han demostrado que DI*A ocurre en la mayoría de estas poblaciones y también se encuentra en la mayoría de las poblaciones nativas de América Central y del Norte, aunque la incidencia en el continente norte generalmente no es tan alta como en el continente sur. Sorprendentemente, DI*A es raro entre los inuit de Alaska y Canadá, pero relativamente común entre los inuits de Siberia (Daniels, 2002). La prevalencia del alelo DI*A también es notablemente alta entre los asiáticos como las poblaciones japonesa, chinas y coreanas, mientras que nunca se ha encontrado en descendientes europeos y africanos no mezclados (Figuroa, 2013; Nathalang et al., 2016).

Según datos bibliográficos reportados por Sans (1991), las frecuencias poblacionales parentales de alelo DI*A en Europa (España, Portugal e Italia) y en África (sub-sahariana) fueron de 0%, mientras que en indígenas de América del Sur tuvo una variación de 0% de mínima a 43,6% de máxima.

Bégat y colaboradores en el 2015 realizaron una revisión del grupo sanguíneo Diego en amerindios de 144 poblaciones, en la que se observaron altas frecuencias de DI*A en los Andes peruanos, en la meseta de Guyana, en la cuenca amazónica del sureste, en una región que comprende el estado brasileño de Pará, y a lo largo de los afluentes del río Amazonas, Tapajos, Xingu y Araguaia. Las frecuencias bajas ocurrieron principalmente en América del Norte y en el extremo sur de América del Sur, encontrándose este alelo totalmente ausente en el Ártico (esquimales y tlingit), el istmo de Panamá (Bribri y Teribe), Tierra de Fuego (Alacalufe), algunas áreas pequeñas en América del Norte (Cherokee), el norte de Brasil y la zona del Chaco (Ayoreo, Zamucoan). Estos datos demuestran grandes variaciones en los rangos de frecuencia y una correlación significativa con los parámetros ambientales y culturales, a la vez que sugieren que los portadores del alelo DI*A cruzaron a América desde Siberia y se han separado a lo largo de las líneas de las principales familias lingüísticas (ver Figura 5).

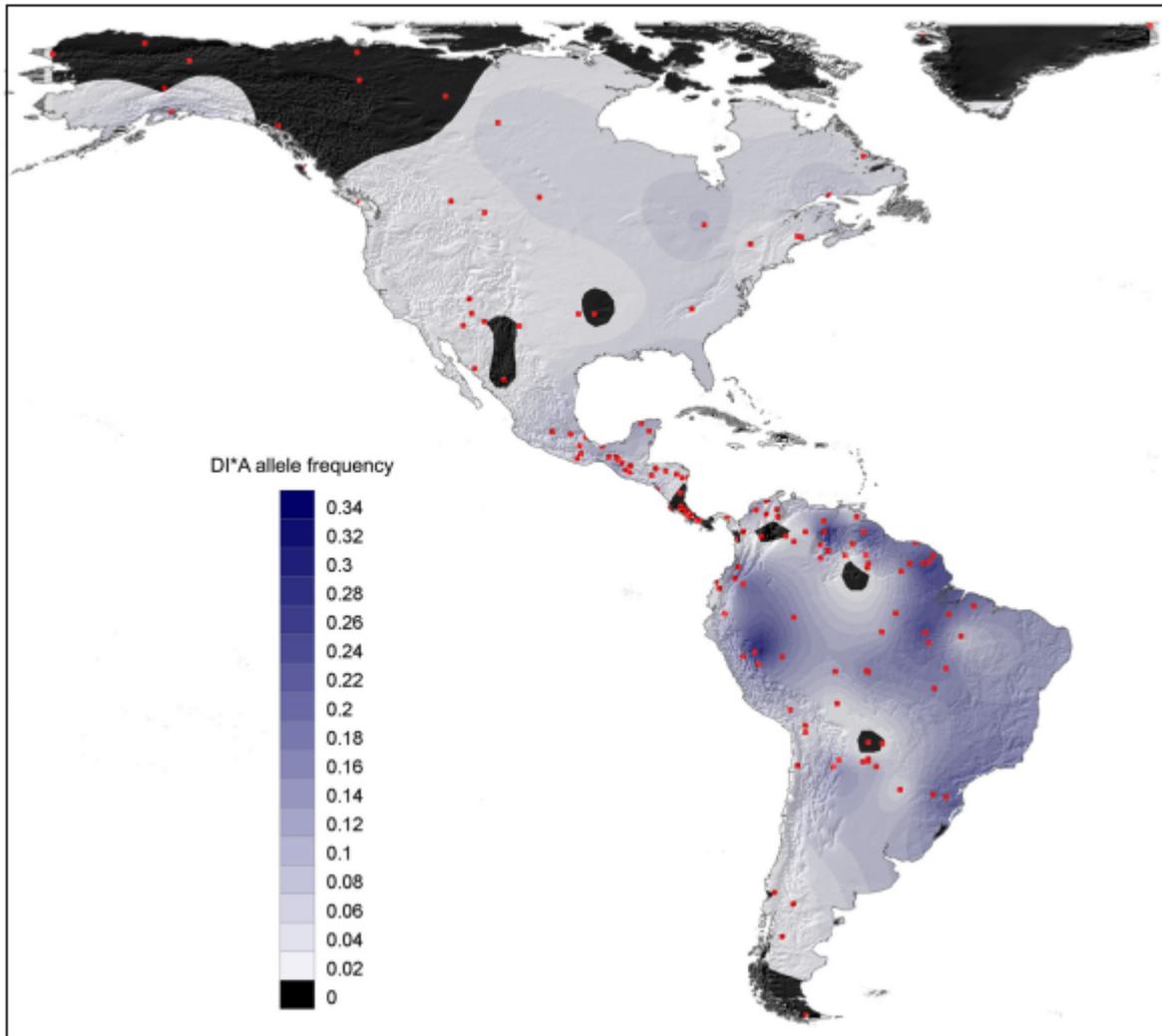


Figura 5. Mapea de frecuencia alélica DI*A del continente americano. Se corresponde con 144 poblaciones de amerindios del norte, centro y sur (Bégat, et al., 2015).

1.3.5. El sistema sanguíneo Duffy

1.3.5.1. Historia del sistema Duffy

El sistema de grupo sanguíneo Duffy fue descrito por primera vez en 1950 por Cutbush y colaboradores, cuando anti-Fya se observó en un paciente hemofílico con una grave reacción de transfusión hemolítica después de múltiples transfusiones sanguíneas. Durante la investigación se observó que el suero del paciente de apellido Duffy, contenía un anticuerpo inusual, no reconocido previamente (Cutbush y Mollison, 1950).

Un año después, Ikin y colaboradores descubrieron el antígeno Fyb en una mujer múltipara en un caso de enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (Ikin et al. 1951). Con estos anticuerpos se definieron los tres fenotipos comunes: Fy(a+b+), Fy(a+b-) y Fy(a-b+).

El fenotipo Fy(a-b-) salió a la luz cuando Sanger y colaboradores (1955), analizando los glóbulos rojos de donantes de sangre afroamericanos con anti-Fya y anti -Fyb, encontraron que las células de casi el 70% no reaccionaron con ambos anticuerpos. Dicho descubrimiento llevó a determinar diferencias en la distribución geográfica de los antígenos de Duffy, cuando se informó que la mayoría de los africanos tenían el fenotipo eritrocitario Fy(a-b-) conocido como nulo (Moulds et al., 1998).

En 1975, se identificó a los antígenos Duffy como receptores de los parásitos *Plasmodium vivax* y *Plasmodium knowlesi*. Este descubrimiento dio explicación a la alta frecuencia del fenotipo Fy(a-b-) reportada en africanos como un mecanismo de resistencia al paludismo (Arreygue-Avila, 2011).

En 1995, se demostró que el defecto molecular responsable de los alelos nulo entre los africanos era una única sustitución de nucleótidos T-C en la región promotora del gen FY (Olsson, 1998).

1.3.5.2. Aspectos genéticos del sistema Duffy

Según la ISBT (2022), el sistema de grupo sanguíneo Duffy fue el octavo en ser descubierto, por lo que su número es 008, su símbolo se representa como FY y consta de cinco antígenos (Fya, Fyb, Fy3, Fy5 y Fy6) transportados en una glicoproteína de membrana multipaso llamada Receptor de quimiocinas atípico 1 (ACKR1), anteriormente conocido como Receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC).

Los antígenos Fy3, Fy5 y Fy6 tienen alta frecuencia en personas europeas y asiáticas del este, son polimórficos en afroamericanos y antígenos privados en partes de África occidental. Fy3 y Fy6 se expresan en los glóbulos rojos de todos los fenotipos de Duffy a excepción del fenotipo Fy(a-b-) mientras que Fy5 también está ausente de las células del fenotipo Rh Nulo; se desconoce el motivo de esta asociación (Daniels, 2002; Daniels y Bromilow, 2007).

Los antígenos Fya, Fyb se consideran como antígenos menores de histocompatibilidad por su inmunogenicidad moderada. Pero pueden generar el rechazo en trasplantes y causar enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), la cual al no ser usual puede no ser detectada rutinariamente y generar complicaciones que van desde leves a graves (Eder, 2006; Arreygue-Avila, 2011).

Anti-Fya es un anticuerpo relativamente común, se encuentra principalmente después de

una transfusión y, con mucha menos frecuencia, después del embarazo; casi nunca ocurre naturalmente, mientras que anti-Fyb es raro, es aproximadamente 20 veces menos común que anti-Fya (ya que el antígeno es más común y menos inmunogénico) y por lo general, no se encuentra solo, sino en sueros que contienen otros aloanticuerpos de glóbulos rojos (Daniels y Bromilow, 2007).

1.3.5.3. Características moleculares del sistema Duffy

El gen ACKR1, codifica para el sistema Duffy y se ubica en el brazo largo del cromosoma 1, en la banda q21-q22. Posee 2 exones que codifican para la glicoproteína Duffy receptora de quimiocinas, compuesta por 336 aminoácidos (transcrito mayor) y 338 (transcrito menor), donde el transcrito mayor deriva del exón 1 y el exón 2 del gen, y el menor es un producto de la transcripción que inicia en el exón 2 y atraviesa la membrana siete veces (Arregue-Avila, 2011; ISBT 2022).

En cuanto a la nomenclatura, la ISBT describe 31 variables alélicas, siendo las más relevantes FY*A también nombrado FY*01 (alelo de referencia) y FY*B (FY*02), las otras variables determinan el fenotipo débil o nulo relacionado a estos alelos. Los alelos FY*A y FY*B tienen relación de codominancia entre ellos y el polimorfismo radica en una mutación puntual en el nucleótido 125, guanina en FY*A y adenina en FY*B (G125A), lo que resulta en una sustitución en el aminoácido número 42, de glicina por ácido aspártico (Gly42Asp), que codifica los antígenos Fya y Fyb (Daniels, 2002; Nathalang et al. 2015).

Según Ansart y colaboradores (2007) el alelo FY*^{ES} (nulo o silencioso) es recesivo ante los alelos FY*A y FY*B y en homocigosidad da lugar al fenotipo Fy(a-b-), común en personas de origen africano, debido a una mutación en la caja GATA-1, que ocasiona un cambio en la base 67 de una timina por una citosina (Nathalang et al. 2015).

Este alelo no puede ser determinado por métodos serológicos (Henríquez et al., 2004). Hasta hace poco se había asociado siempre con el FY*B en población de origen africano, en las que esta mutación evita la expresión de FY*B en antígenos de glóbulos rojos pero no en otros tejidos. Sin embargo, un estudio demostró que la mutación también está relacionada al alelo FY*A en individuos de Nueva Guinea, pero solo en estado heterocigota, con una frecuencia de 0,022 (Zimmerman, 1999; Daniels, 2002).

Otro alelo, FY*X, provoca la detección débil del antígeno Fyb; es producido por el cambio en la posición 286 de cistina por timina (C286T) y resulta en el cambio de una arginina por

una cisteína en el aminoácido 89 de la proteína (Ansart-Pirenne et al., 2007; Arreygue-Avila 2011).

A continuación (Figura 6) se muestran esquemáticamente las mutaciones antes descritas.

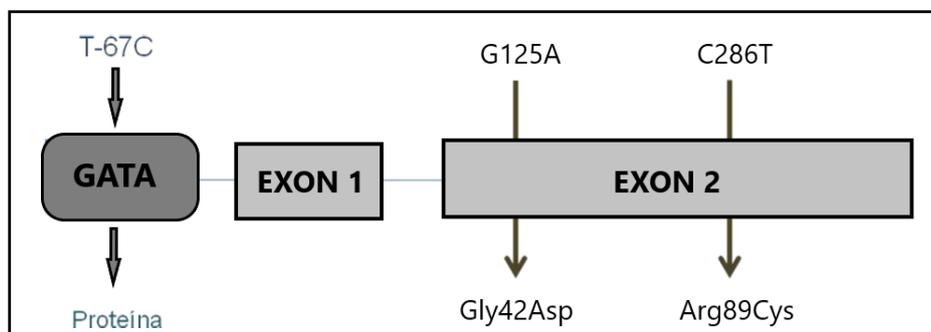


Figura 6. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del gen DARC. Se esquematizan los sitios donde ocurren los cambios que originan los distintos fenotipos del grupo sanguíneo Duffy. (Modificado de Arreygue-Avila, 2011).

1.3.5.4. Distribución mundial

Gran parte de la investigación sobre este grupo sanguíneo se ha centrado en establecer patrones de expresión característicos entre las poblaciones y esto aumentó sustancialmente su importancia con el descubrimiento de su relación como puerta de entrada de los parásitos de la malaria en los glóbulos rojos humanos (Miller et al., 1976; Howes et al., 2011).

Según datos presentados por Howes y colaboradores (2011) en una revisión bibliográfica la heterogeneidad alélica es mayor en las Américas, con los tres alelos predichos como presentes y con solo parches localizados de predominio de alelos individuales. El alelo FY*A es el más abundante a nivel mundial, con frecuencias estimadas en 67,7%. Se agrupa principalmente en el continente asiático donde está cerca de la fijación en la zona oriental, y sigue siendo alto, con frecuencias medias por encima del 80% previstas en grandes extensiones del sur de Asia, Australia, Mongolia y partes orientales de China y Rusia, encontrándose también en altas frecuencias (> 90%) en Alaska y el noroeste de Canadá. El alelo FY*B, es el menos prevalente a nivel mundial. Las frecuencias por encima del 50% están restringidas a Europa y zonas de las Américas, especialmente a lo largo de la costa este de los Estados Unidos. Por otro lado, el alelo FY*^{ES} se distribuye principalmente en la región africana subsahariana, donde estudios revelaron que las frecuencias alélicas de 30 países de este continente eran mayores a 90%, alcanzado incluso la fijación en partes de

África occidental, central y oriental. Sin embargo, el alelo no se limita al subcontinente africano continental, también tiene frecuencias estimadas superiores al 80% en la isla de Madagascar y superiores al 50 % en la Península Arábiga.

La población europea presenta frecuencias medias de 0,384 para Fy*A y 0,609 para Fy*B, mientras que Fy*ES es muy escaso con tan solo 0,007. En América Fy*A alcanza valores medios de 0,374, Fy*B promedia 0,405 y Fy*ES 0,220 pero de estos solo la mitad (0,110) se encuentran en homocigosis correspondiéndose al fenotipo Fy(a-b-). Por su parte en la población de África se dan los mayores valores del fenotipo nulo, Fy*ES alcanza frecuencias promedio de 0,776, Fy*A 0,115 y Fy*B 0,109 (Howes et al., 2011). En la Figura 7 se puede observar la distribución en los diferentes continentes para cada uno de los 3 alelos.

En el trabajo de Sans (1991), se comparan las frecuencias obtenidas para Uruguay (Fy*A=0,394, Fy*B=0,515 y Fy*ES=0,091), con un compilado de datos de frecuencias máximas y mínimas obtenidas para las poblaciones parentales europeas (España, Portugal e Italia), africanas (África sub-sahariana) e indígenas de América del Sur. En europeos el alelo Fy*B predomina con máximas de 0,621 y mínimas de 0,573, seguido por Fy*A que presentó máximas de 0,427 y mínimas de 0,369, no encontrándose el alelo nulo. En africanos se dieron las mayores frecuencias de Fy*ES con máximas de 0,994 y mínimas de 0,957, mientras que los otros alelos se encontraron en muy baja frecuencia. Las poblaciones indígenas se caracterizaron por presentar la máxima variación en la frecuencia del alelo Fy*A (máximas=1,000 y min=0,237) y Fy*B (máximas=0,763 y mínimas=0,000) pero no se encontraron individuos portadores del alelo Fy*ES.

Esta variación poblacional en la distribución de los antígenos del sistema Duffy proporciona uno de los pocos ejemplos conocidos de ventaja selectiva conferida por un fenotipo de grupo sanguíneo (Moulds et al., 1998). Sin embargo, recientemente estudios han informado muchos casos de infección por *P. vivax* en poblaciones Duffy negativas de África, pero se ha observado que la infección es menos grave que en los africanos Duffy positivos (Niangaly et al., 2017, Gunalan et al., 2018).

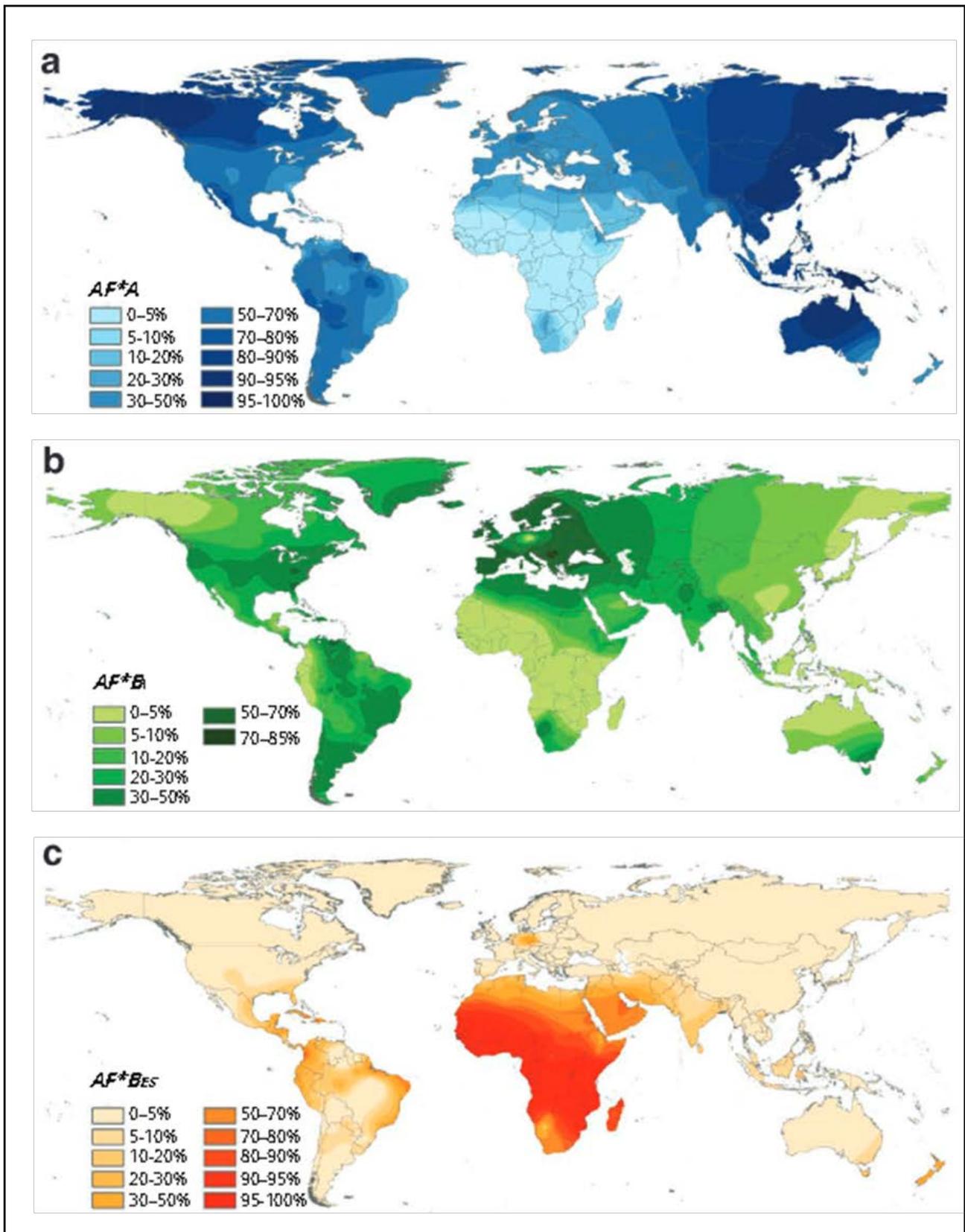


Figura N^o 7. Mapas de distribución global de frecuencias alélicas del grupo sanguíneo Duffy (Howes et al., 2011).

2. Objetivo

La actual investigación propone contribuir con nuevos datos respecto al proceso de formación de la población uruguaya moderna, mediante la caracterización de la población de los departamentos de Tacuarembó y Rivera (noreste del Uruguay), a partir del análisis de los sistemas sanguíneos ABO, Diego y Duffy. Para esto se determinan sus variantes moleculares y su vinculación con la ancestría. Para el caso del sistema ABO, se enfatizan las variantes del alelo O que permiten una mejor aproximación al aporte indígena en esta zona del país.

2.1. Objetivos específicos

1. Establecer estrategias moleculares para determinar los principales alelos de los sistemas sanguíneos ABO, Duffy y Diego.
2. Determinar fenotipos y genotipos de las muestras analizadas.
3. Calcular las frecuencias fenotípicas, genotípicas y alélicas.
4. Determinar la distancia genética entre Tacuarembó, Rivera y otras poblaciones mundiales.
5. Calcular los aportes genéticos europeo, africano e indígena para ambos departamentos en general y de acuerdo al prestador de salud público o privado.

3. Materiales y métodos

A continuación se muestra un diagrama con el flujo de trabajo vinculado a las tareas realizadas en la tesis (Figura 8). El primer paso fue el muestreo, luego extracción y cuantificación de ADN, PCR y enzimas de restricción para identificar fenotipos y/o genotipos. Finalmente análisis estadísticos para interpretar los resultados.

Todas las técnicas de laboratorio fueron realizadas en el PDU de Diversidad de Genética Humana, del CENUR Noreste, sede Tacuarembó.

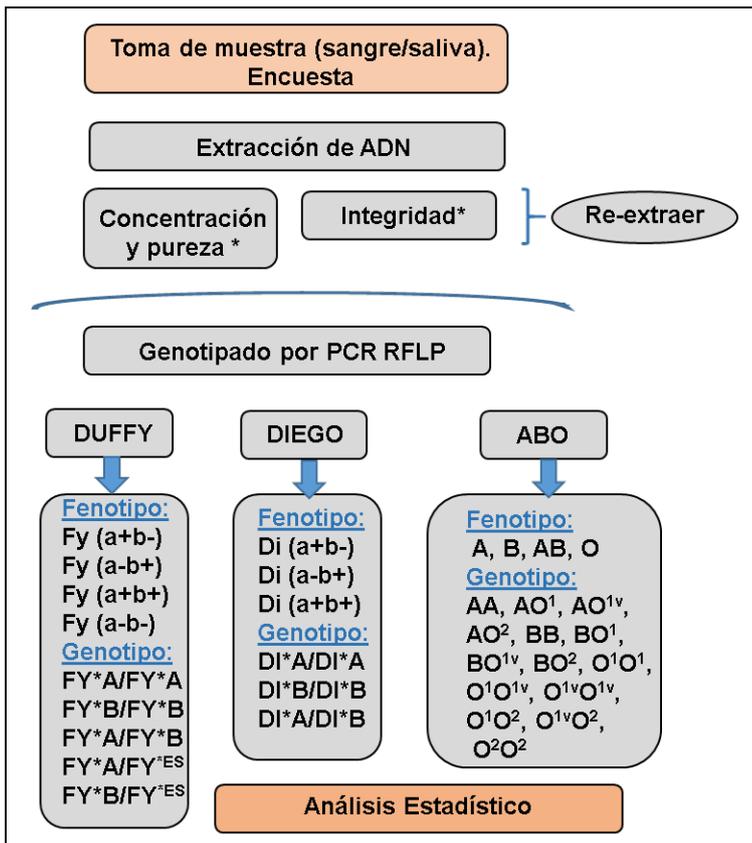


Figura 8. Flujo de trabajo. Solamente aparecen los fenotipos y genotipos cuantificados en este estudio.

3.1. Muestreo

Se utilizó una muestra de ADN de 200 individuos mayores de edad, votantes en la región por lo menos en las elecciones municipales de 2010 y no emparentados entre sí, 150 residentes en el departamento de Tacuarembó y 50 en el departamento limítrofe de Rivera.

Previo a la extracción de las muestras de sangre o saliva se obtuvo el consentimiento informado de cada donador, asegurando la confidencialidad de los datos y el acceso a la información una vez finalizada la investigación. También se completó una encuesta para determinar datos generales y genealógicos del individuo, incluyendo apellidos y lugares de nacimiento de los ancestros, así como características familiares que les pareciera interesante resaltar y el grupo sanguíneo en caso de que contaran con dicha información.

El aval fue obtenido de la Comisión de Ética de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, expediente 121900-000087-14 (para 100 muestras del banco de ADN del Laboratorio de Diversidad de Genética Humana, de la sede Tacuarembó del CENUR Noreste, colectadas previo al 2019) y expediente 121900-000162-20 (para 100 muestras colectadas en el año 2021, en el marco del proyecto CSIC “Variabilidad genética humana en

la región norte del Uruguay y aspectos microevolutivos subyacentes”, cuyos responsables son Mónica Sans y Pedro Hidalgo y en el cual participo).

Para las 100 muestras de Tacuarembó colectadas previo a 2019 el muestreo fue aleatorio, pero para las restantes 100 colectadas en 2021 se procuró un balance entre los participantes en cuanto a atención en Salud Pública y mutualistas (se agregó este dato a la encuesta), para evitar cualquier sesgo socioeconómico. Esto se debe a que un reciente estudio de Sans y colaboradores (2021), reveló que para la población de Montevideo se encontraron diferencias en la ancestría indígena entre quienes se atienden en centros de salud pública con relación a los de atención mutual, lo cual puede, en términos generales, relacionarse con el nivel socioeconómico.

Para Tacuarembó las muestras están representadas mayormente por individuos residentes de la ciudad capital, pero también 30 muestras de otras localidades, representadas por 10 individuos de Villa Ansina, 4 de Caraguatá, 4 de Costa de los Novillos, 3 de Paso del Cerro y en menor medida Curtina, Batoví y otras localidades; no se muestrearon individuos residentes en la ciudad de Paso de los Toros ni San Gregorio de Polanco y zonas aledañas, poblaciones que han sido indicadas con diferencias al resto del departamento de acuerdo a Rodríguez-Larralde y colaboradores (2021). La muestra de Rivera es exclusivamente de personas residentes en la ciudad homónima.

3.2. Extracción y purificación de DNA

Para el caso de Tacuarembó se realizó la extracción de ADN de 100 muestras, a partir del material biológico almacenado previamente, las restantes 100 extracciones se realizaron a partir de material obtenido en el marco del proyecto financiado por CSIC. Las extracciones fueron a partir de saliva en las muestras de Tacuarembó y sangre en las muestras de Rivera.

En las muestras de sangre se utilizó el protocolo de método salino “Salting-Out”, con el objetivo de disminuir costos y de obtener mayores concentraciones (Anexo 2). En el caso de verse afectada la pureza (solamente en sangre almacenada años atrás) se utilizó un kit de purificación Zymo Research “DNA Clean y Concentration™-5”.

Para la saliva se utilizó un protocolo de extracción originalmente elaborado para su aplicación en sangre modificado por Bernardo Bertoni (Anexo 3).

3.3. Pureza e integridad del ADN

La concentración del ADN (260nm) se valoró utilizando un espectrofotómetro NanoVue Plus™ y se corroboró mediante el fluorómetro Qubit4 de Invitrogen (el cual es más preciso por medir sólo ADN). La pureza (relación 260/280nm) para estar en el rango óptimo se debe encontrar en el intervalo 1,8-2,0, una razón inferior indica contaminación con proteínas y superior indica presencia de ARN.

La calidad del ADN extraído se verificó por separación y visualización de los ácidos nucleicos por electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa al 1%, teñidos con Gel-Red (BIOTIUM), que se intercala en el ADN y emite fluorescencia al ser iluminado con luz UV. Las electroforesis se llevaron a cabo con la fuente y cubas horizontales (Labnet), usadas a 100 volts durante 60 minutos con amortiguador TBE 1X. Una alícuota de 5 µL de ADN se mezcló con 2 µL de amortiguador de carga Gel Loading Dye Blue 6x (Biolab), y se colocó en el pocillo correspondiente, identificando cada uno previamente. Finalmente los geles fueron fotografiados con el transiluminador (Cleaver Scientific Ltd) mediante el uso de una cámara (Canon G15).

3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y enzimas de restricción

Para todas las técnicas se utilizó 1ul de ADN (con una concentración estimada entre 20 y 200 ul según qubit), en caso de ser superior se realizó una dilución. Para la preparación de la mezcla: ADN taq polimerasa (Invitrogen) y taq de la marca NEB (New England Biolabs), dependiendo del sistema utilizado, el conjunto de dNTPs (Thermo Scientific, 10 mM), agua libre de nucleótidos, y los *primers* seleccionados para cada técnica (25 pmol/ul). Los termocicladores empleados fueron Labnet™ MultiGene™ OptiMax y BioRad T100.

Para visualizar el resultado de los productos PCR se utilizaron geles de agarosa al 1,5% que se dejaron correr por 40 minutos a 100V. En el último o primer carril se sembró el marcador de peso molecular correspondiente a 50 o 100 pb, para poder determinar el tamaño de los fragmentos, y en cada PCR se usó un control negativo. Las condiciones específicas de cada sistema se detallarán a continuación.

Las enzimas de restricción, correspondientes a cada técnica se usaron siguiendo las recomendaciones del fabricante, pero disminuyendo la reacción para mayor rendimiento de las mismas y sus productos se sembraron en geles de agarosa 3% o poliacrilamida 10%.

3.4.1. Sistema ABO

Las condiciones de PCR y enzimas de restricción para ABO fueron las descritas por Hummel et al. (2002) las cuales se ajustaron experimentalmente a nuestras condiciones.

Se utilizaron dos juegos de *primers*, uno para el exón 6 (posición del nucleótido 261-297) y otro para el exón 7 (posición del nucleótido 796-802) y la taq de Invitrogen (Invitrogen™ ADN polimerasa *Taq*, recombinante). Las secuencias y condiciones de ciclado se describen en las Tablas 3 y 4.

Primer	Secuencia
Exón 6 (Forward)	5'CTCTCTCCATGTGCAGTAGGAAGG3'
Exón 6 (Reverse)	5'GAACTGCTCGTTGAGGATGTGCG3'
Exón 7 (Forward)	5'AAGGACGAGGGCGATTTCTA3'
Exón 7 (Reverse)	5'GCTGCAACTCTTGCACCGACC3'

Tabla 3. Secuencia de los juegos de *primers* utilizados en ABO.

		Amplificación (35 ciclos)					
Primer		Pre.	Des.	Alin.	Ext.	Estab.	Fin.
Exón 6	Temperatura (C°)	94	94	56	72	72	8
	Tiempo (min)	11	1	1	1	10	∞
Exón 7	Temperatura (C°)	94	94	63	72	72	8
	Tiempo (min)	11	1	1	1	10	∞

Tabla 4. Ciclado establecido para cada uno de los *primers* ABO.

Las enzimas de restricción usadas para poder caracterizar los alelos fueron: Rsa I, Nla III, Mnl I, Tail (isoesquizomero: HpyCH4IV), tanto de la marca Thermo Scientific como NEB (New England Biolabs). En la Tabla 5 se pueden observar las características de las mismas en cuanto a tamaño del producto de PCR y fragmento de restricción así como también los polimorfismos que determinan cada alelo.

La electroforesis de los productos de restricción se realizó sembrando 10 ul en geles de agarosa al 3% que se dejaron correr por una hora y media a 100 V. En caso de tener dudas se realizaron geles de poliacrilamida al 10% que se dejaron correr 3 horas aproximadamente. Dichas técnicas permitieron identificar los alelos principales A, B, O¹, O^{1v} y O², de acuerdo al patrón de corte (Tabla 6).

	Exón 6		Exón 7	
Tamaño amplicón	103/104 pb		64 pb	
Enzima utilizada	Rsa I	Tail	Nla III	Mnl I
Fragmento obtenido	66 y 37	73/72 y 31 pb	37 y 27 pb	42/41 y 23/22 pb
Alelo	261 pn	297 pn	796 pn	802 pn
A	G	A	C	G
B	G	G	A	G
O ¹	Δ	A	C	G
O ^{1v}	Δ	G	C	G
O ²	G	G	C	A

Tabla 5. Polimorfismos de secuencia, longitudes de producto de PCR y RFLP para los diferentes alelos ABO. Adaptada de Acosta, 2015. Se indican los tamaños de los amplicones esperados para cada uno de los exones, así como los fragmentos que se obtienen una vez digeridos los productos de PCR y para cada alelo el sitio de restricción que reconoce cada enzima. (pb: pares de bases, pn: posición del nucleótido, Δ: deleción).

Fenotipo	Genotipo	RsaI	Tail	NlaIII	MnII
A	AA	-/-	-/-		
A	AO ¹	+/-	-/-		
A	AO ^{1v}	+/-	+/-	-/-	-/-
A	AO ²	-/-	+/-	-/-	+/-
B	BB	-/-	+/+	+/+	-/-
B	BO ¹	+/-	+/-	+/-	-/-
B	BO ^{1v}	+/-	+/+	+/-	-/-
B	BO ²	-/-	+/+	+/-	+/-
AB	AB	-/-	+/-	-/-	+/-
O	O ¹ O ¹	+/+	-/-		
O	O ¹ O ^{1v}	+/+	+/-		
O	O ^{1v} O ^{1v}	+/+	+/+		
O	O ¹ O ²	+/-	+/-	-/-	+/-
O	O ^{1v} O ²	+/-	+/+	-/-	+/-
O	O ² O ²	-/-	+/+	-/-	+/+

Tabla 6. Patrones de restricción de los genotipos ABO. Adaptada de Hummel et al., (2002). El símbolo (-/-) se utiliza para indicar que la enzima no digirió el fragmento, caso contrario de (+/+) donde digiere completamente el producto de PCR, mientras que (+/-) indica que un alelo se digirió y otro no. Los espacios sin completar indican que no es necesario el uso de enzimas porque el genotipo ya se identificó.

3.4.2. Sistema Diego

Para el sistema Diego se utilizó la técnica definida por Baleotti et al. (2003) que consiste en la amplificación de un segmento de 149 pares de bases del exón 19 del gen SLC4A1 y su análisis por RFLPs.

Se utilizó la enzima taq de NEB (*Taq* DNA Polymerase with Standard *Taq* Buffer) ya que la de Invitrogen generaba bandas más claras y con dímeros próximos a las alturas del corte de la enzima.

La enzima MspI se utilizó de acuerdo a recomendaciones del fabricante. Esta reconoce y corta la secuencia CCGG aproximadamente a la mitad de la segmento (70-79 pb) cuando se trata de DI*B, mientras que el alelo DI*A tiene la mutación C→T por lo que pierde el sitio de corte y se visualiza el fragmento de 149 pb.

Los productos de PCR y de restricción se corrieron con las mismas condiciones que en el caso anterior, usando geles de poliacrilamida solo para poder visualizar mejor el corte de la enzima en caso de dudas.

Como se evidenció una frecuencia muchísimo más alta de la esperada para el alelo DI*A en una población de nuestras características, se sospechó que la enzima no era 100% eficiente en su corte. En estos casos se agregó más enzima y se dejó incubando toda la noche. Cuando las dudas de la eficiencia de la enzima persistían se enviaron las muestras sospechosas a secuenciar. Para ellos se utilizó la técnica propuesta por Nathalang et al. (2016), cuyos *primers* generan un amplicon de 598 pb.

Las secuencias y condiciones de ciclado para ambas técnicas se describen a continuación en las Tablas 7 y 8.

Primer	Secuencia
Di (Forward)	5'TGGCGCATGCACTTATTCAC3'
Di (Reverse)	5'TTCCTGAAGATGAGCGGCAG3'
Di.sec (Forward)	5'TTAGGGGTCCAGCTCACTCA3'
Di.sec (Reverse)	5'TGACCGCATCTTGCTTCTGT3'

Tabla 7. Secuencia de los juegos de *primers* utilizados en Diego. Di.sec se corresponde a los *primers* de la secuencia.

		Amplificación (40 y 35 ciclos)					
Primer		Pre.	Des.	Alin.	Ext.	Estab.	Fin.
Di	Temperatura (C°)	95	95	62	72	72	8
	Tiempo (min)	10	0,50	0,50	0,50	5	∞
Di sec	Temperatura (C°)	95	95	62	72	72	8
	Tiempo (min)	10	0,40	0,40	0,40	5	∞

Tabla 8. Ciclado establecido para cada uno de los primers de Diego.

3.4.3. Sistema Duffy

Para el sistema Duffy también se realizó un ensayo de RFLP utilizando como referencia la técnica propuesta por Toumamille et al., (1995) que permite distinguir entre los alelos FY*A y FY*B y que se correlacionan con un sitio de restricción BanI. En el caso del alelo FY*B el segmento de 159 pb no se corta, mientras que para el alelo FY*A se genera un sitio de corte con fragmentos de 86 y 73 pb, que permitió determinar los fenotipos Fy(a-b+), Fy(a+b-), y Fy(a+b+). En este caso los productos de restricción no dejaban lugar a duda en geles de agarosa al 3% por lo que no fue necesario utilizar geles de poliacrilamida como recomendaba el artículo.

Para la región promotora "GATA" del gen Duffy, que permite reconocer el alelo FY*ES, se utilizó la técnica definida por Nathalang y colaboradores (2019). En esta el fragmento de 392 pb tratado con la enzima de restricción Styl genera fragmentos de 205, 110 y 65 pb para Duffy negativo, mientras que la combinación de bandas de 205, 110 y 77 pb se corresponde a Duffy positivo. Lamentablemente dicha técnica no se pudo replicar en nuestras condiciones ya que se obtuvo el fragmento indicado, pero el corte de la enzima no nos permitió visualizar el producto de menor tamaño bajo ninguna condición.

Para subsanar dicho inconveniente se logró utilizar los datos de 16 muestras de Tacuarembó y 25 de Rivera, que fueron genotipadas en CEGEN-FPGMX (Centro Nacional de Genotipado y Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica) utilizando el panel "Axiom Spain Biobank Array" en el marco del proyecto "Variabilidad genética humana en la región norte del Uruguay y aspectos microevolutivos subyacentes. El panel proporciona una alta cobertura de todo el genoma y posee 2336 marcadores asociados a grupos sanguíneos. En este caso particular se analizó el rs 2814778 característico del fenotipo Duffy nulo, para lo cual se utilizó el programa PLINK 1.8 (Purcell et al., 2007).

Las secuencias y condiciones de ciclado se describirán a continuación en las Tablas 9 y 10.

Primer	Secuencia
P3 (Forward)	5'AACTGAGAACTCAAGTCAGC3'
P4 (Reverse)	5'ATGAAGAAGGGCAGTGCAGAGT3'
FY*N (Forward)	5'GGGCTGGGCATAAAAGTCA3'
FY*N (Reverse)	5'AGGGGAAAGAAAACATCAAGGGTTC3'

Tabla 9. Secuencia de los juegos de *primers* utilizados en Duffy. P3 y P4 *primers* empleados para determinar los alelos FY*A y FY*B, FY*N (Forward y Reverse) *primers* para determinar el alelo nulo.

Primer		Amplificación (35 ciclos)					
		Pre.	Des.	Alin.	Ext.	Estab.	Fin.
P3/P4	Temperatura (C°)	94	94	60	72	72	8
	Tiempo (min)	10	0,40	0,40	0,40	5	∞
FY*N	Temperatura (C°)	94	94	61	72	72	8
	Tiempo (min)	10	0,40	0,40	0,40	5	∞

Tabla 10. Ciclado establecido para cada uno de los *primers* de Duffy.

3.5. Análisis estadístico

Las frecuencias genotípicas fueron determinadas por observación directa y a partir de ellas se calcularon las frecuencias alélicas, utilizando el modelo de Hardy-Weinberg. La existencia de posibles desviaciones del equilibrio se evaluó mediante el complemento de Excel GenAEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

La estructura genética de las poblaciones del noreste uruguayo fue investigada mediante el análisis molecular de la varianza (AMOVA) y de los estadísticos F (Fst, Fis y Fit) de Weir y Cockerham (1984). El estadístico Fis (coeficiente de endogamia) mide el déficit de heterocigotos en cada población, mientras que Fst (índice de fijación) lo mide entre poblaciones y Fit (coeficiente de endogamia total) calcula el déficit global de heterocigotos. Estos análisis fueron realizados paralelamente con el programa Arlequín 3.5 (Excoffier y Lischer, 2015) y GenAEx 6.5, con la única diferencia que Arlequin da valores más exactos (sin redondeo).

Para comparar las frecuencias de las poblaciones mundiales se usó Arlequín 3.5, con el cual obtuvimos los datos de Fst, su valor p y significancia, y para distinguir entre los grados de diferenciación genética se utilizaron los criterios de Wright (1978) donde los valores

del índice F_{st} , se categorizan en diferencias pequeñas (0 a 0,05), diferencias moderadas (0,05 a 0,15), diferencias grandes (0,15 a 0,25) y diferencias muy grandes (mayor a 0,25).

Para visualizar la forma en que se agrupan las poblaciones se realizaron dendrogramas UPGMA y análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando el programa PAST 3.0 por sus siglas *PA*laeontological *S*Tatistics (Hammer, 2018).

La elección del método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*), fue debido a que en comparación con otros métodos proporciona un árbol razonablemente bueno para inferir relaciones obtenidas mediante frecuencias génicas (Herrera-Paz, 2016).

También se realizó análisis de coordenadas principales (PCoA), que permite representar similitudes y/o diferencias entre un set de datos, siendo un método que reduce las múltiples variables utilizadas en la matriz a dos dimensiones, para poder ser luego representadas en un gráfico, donde los ejes representan el porcentaje de variabilidad de los datos originales (Acosta, 1015). Esta medida asume que la diferenciación genética ocurre solo por deriva genética (sin mutaciones), siendo eficiente para comparaciones entre poblaciones con pequeños tamaños efectivos y que han divergido hace un número relativamente bajo de generaciones (Demarchi, 2009).

La contribución relativa de las poblaciones parentales al acervo genético actual de la población del noreste para los tres sistemas sanguíneos se estimó a través del método de identidad genética, utilizando el programa Admix95 (Chakraborty, 1985, modificado por Bernardo Bertoni), tomando como parentales las frecuencias de las poblaciones de Europa, África e indígena sudamericano.

4. Resultados

4.1. Análisis de laboratorio

4.1.1. Extracción de ADN

Con ambas técnicas utilizadas se logró extraer ADN, aunque con el protocolo de sangre se obtuvieron mejores resultados, ya que las concentraciones fueron mayores al igual que la integridad del ADN (Figura 9). La calidad determinada por la relación A260/280 fue muy buena para ambas técnicas, encontrándose la mayoría de las muestras dentro del valor óptimo o con muy poca desviación.

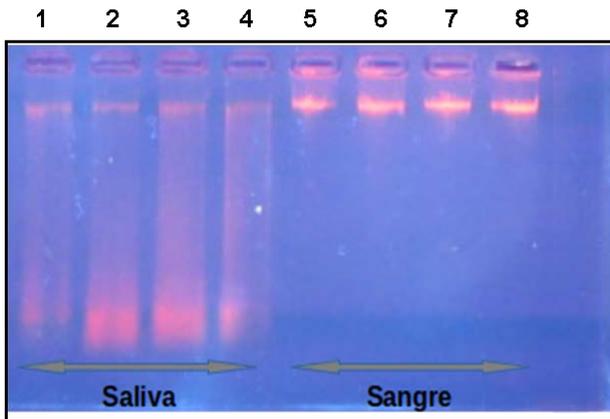


Figura 9. Electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1%. Carril 1, 2, 3 y 4 ADN extraído a partir de muestras de saliva, en estas se puede apreciar “smear” (barrido) a lo largo de los carriles, posiblemente debido a la presencia de ARN degradado. Carril 5, 6, 7, 8 ADN extraído a partir de muestras de sangre, en estos se puede ver una banda única sin degradación.

4.1.2. PCR-RFLP

Sin necesidad de estandarizar las medidas de concentración obtenidas mediante espectrofotometría, y a pesar de la diferencia en la calidad del ADN, ambas técnicas permitieron realizar PCR exitosas para todos los marcadores, obteniéndose bandas lo suficientemente intensas para luego realizar enzimas de restricción, donde los fragmentos de menor tamaño tienden a verse más tenues.

4.1.2.1. Sistema ABO

El 100% de las muestras a las que se le realizó la extracción de ADN amplificaron mediante PCR, tanto para el exón 6 como para el 7. Los productos obtenidos mediante el corte de las enzimas de restricción se interpretaron según lo señalado en la Tabla 6, mostrando un poder de resolución suficiente para diferenciar los distintos genotipos mediante gel de agarosa 3% (la poliacrilamida solamente se llevó a cabo para despejar dudas ya que esta se caracteriza por tener una mejor resolución). Los resultados genotípicos se compararon con los fenotipos serológicos en el caso de ser aportados por los entrevistados y fueron concordantes en un 91% (11 donadores para los que no coincidió de 121 datos informados). A tres de ellos se le realizó prueba serológica y los resultados coincidieron con los datos moleculares, por lo que las diferencias se asumen a confusiones personales en el momento de la entrevista.

En la Figura 10 se muestra la digestión del exón 6 con las enzimas de restricción Rsa I y Tai I, que permitieron diferenciar el genotipo salvo para las muestras 2, 3 y 7 a las que se le tuvo que amplificar el exón 7 y realizar digestión con sus respectivas enzimas (ver Anexo 4).

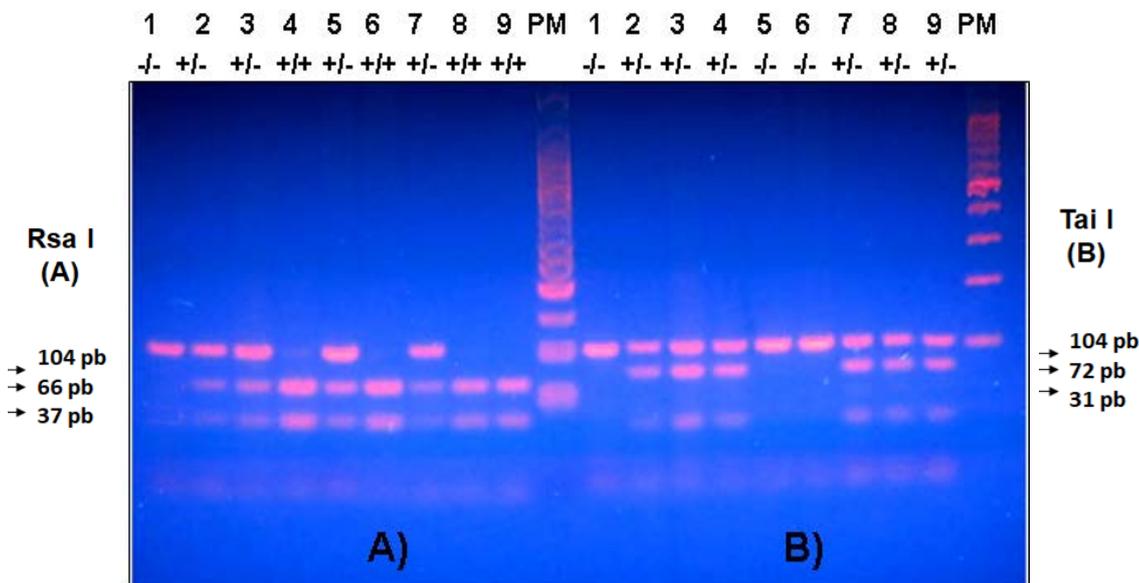


Figura 10. Electroforesis del sistema ABO en geles de agarosa al 3%. En el mismo se muestra la digestión de 9 muestras con la enzima Rsa I (A) y Tai I (B). A) Las muestras 4, 6, 8 y 9 muestran el patrón característico de corte de ambos alelos (fragmentos de 66pb y 37pb). En las muestras 2, 3, 5 y 7 se puede ver que uno de los alelos fue digerido (por lo que vemos las bandas de 66pb y 37pb) y el otro no (por lo que vemos el amplicón completo de 104pb). En la muestra 1 ninguno de los alelos fueron cortados por lo que únicamente podemos ver una banda sin digerir de 104pb. En el carril 10 se visualiza el marcador de peso molecular (PM) utilizado (NEB, 50 bp DNA Ladder, 50 bp - 1350 bp). B) Las muestras 2, 3, 4, 7, 8 y 9 muestran que uno de los alelos fue digerido (por lo que vemos las bandas de 72pb y 31pb) y el otro no (por lo que vemos el amplicón completo de 104pb). En las muestras 1, 5 y 6 ninguno de los alelos fueron cortados por lo que únicamente podemos ver una banda sin digerir de 104pb. En el carril 20 se visualiza el marcador de peso molecular (PM) utilizado (Thermo Scientific™, 100 bp GeneRuler, 100-1000 bp).

4.1.2.2. Sistema Diego

La técnica descrita por Baleotti et al. (2003) se utilizó para el 100% de las muestras y las que generaban dudas (20 de Tacuarembó y 14 de Rivera) se enviaron a secuenciar al Instituto Pasteur de Montevideo y a Macrogen, Corea del Sur.

A continuación (Figura 11) se muestra un gel de poliacrilamida y en el Anexos 5 se pueden apreciar más resultados de las técnicas empleadas.

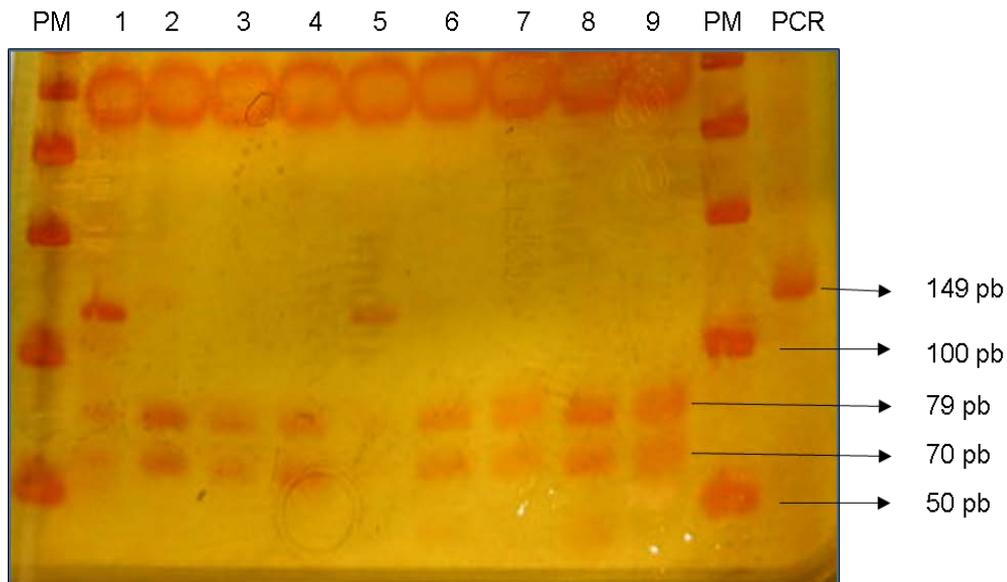


Figura 11. Electroforesis del sistema Diego en gel de poliacrilamida al 10%. En el carril número 1 se aprecia el marcador de peso molecular (PM) utilizado (Bioline, 50 bp DNA Ladder). La muestra 1 se corresponde a un individuo heterocigoto, donde se puede ver que uno de los alelos fue digerido (79pb y 70pb) y el otro no (149pb), la muestra 5 también lo es pero a nivel de gel los resultados no son claros. Las muestras 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 son homocigotas (DI*B/DI*B). Los 2 últimos carriles se corresponden al marcador de peso molecular (Bioline, HyperLadder 50bp, 50-2000 bp) y a un producto de PCR sembrado como referencia.

4.1.2.3. Sistema Duffy

Todas las muestras amplificaron correctamente para determinar los fenotipos Fy(a-b+), Fy(a+b-) y Fy(a+b+), obteniéndose bandas fuertes y óptimas para ser digeridas (Figura 12). Pero, como se mencionó anteriormente, no se pudo determinar el alelo FY*^{ES} en ninguna de las muestras, razón por la cual se genotiparon solamente 16 individuos de Tacuarembó y 25 de Rivera mediante el servicio el *array* "Axiom Spain".

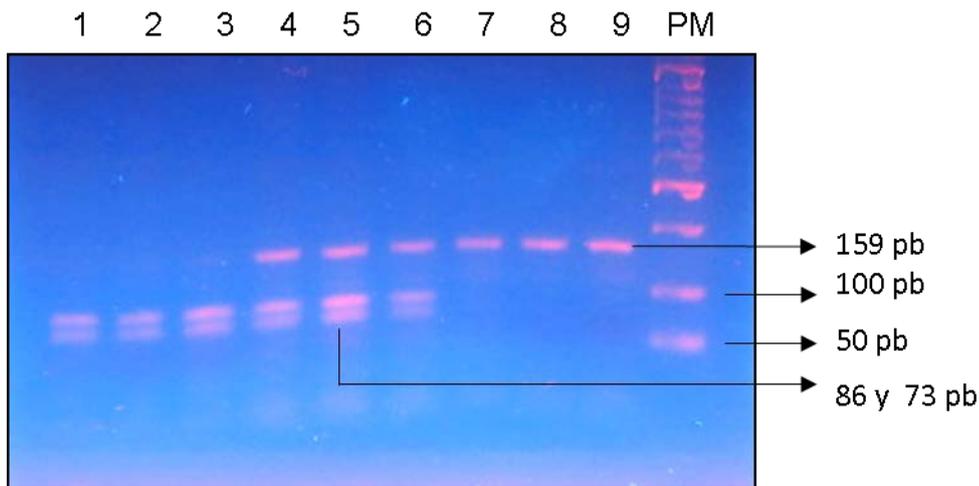


Figura 12. Electroforesis del sistema Duffy en geles de agarosa al 3%. En el carril 1, 2 y 3 se observa el patrón característico de corte de ambos alelos (fragmentos de 86pb y 73pb), el cual se corresponde al fenotipo Fy(a+b-). En las muestras 4, 5 y 6 se puede ver el fenotipo Fy(a+b+), donde uno de los alelos fue digerido (por lo que vemos las bandas de 86pb y 73pb) y el otro no (amplicón completo de 159pb). En 7, 8 y 9 ninguno de los alelos fueron cortados por lo que únicamente podemos ver una banda sin digerir de 159pb, siendo esto característico de Fy(a-b+). En el carril 10 se visualiza el marcador de peso molecular (PM) utilizado (NEB, 50 bp DNA Ladder, 50 bp - 1350 bp).

4.2. Frecuencias y equilibrio de Hardy-Weinberg (HW)

A continuación pueden apreciarse los resultados para las 200 muestras tipificadas (150 de Tacuarembó y 50 de Rivera) usando PCR-RFLP para los 3 sistemas sanguíneos que se analizaron por separado para cada departamento.

4.2.1. Sistema ABO

En la Tabla 11 se puede visualizar el número de individuos (observados y esperados) correspondiente a cada genotipo para ambas poblaciones y en las Figuras 13 y 14 se puede observar las frecuencias genotípicas. En relación a estas se puede afirmar que ambas poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, para el caso de Tacuarembó ($X^2=3,947$; $gl=10$; $p=0,95$) y Rivera ($X^2=11,545$; $gl=10$; $p=0,317$) siendo no significativa la diferencia entre frecuencias observadas y esperadas.

Genotipo	RIVERA:		TACUAREMBO:	
	Nº Obs.	Nº Esp.	Nº Obs.	Nº Esp.
O ¹ O ¹	7	5,780	25	24,000
O ¹ O ^{1v}	6	9,180	33	35,200
O ^{1v} O ^{1v}	5	3,645	13	12,907
O ¹ O ²	0	0,680	3	2,000
O ^{1v} O ²	1	0,540	0	1,467
O ² O ²	0	0,020	0	0,042
AO ¹	13	10,200	29	29,600
AO ^{1v}	8	8,100	24	21,707
AO ²	0	0,600	2	1,233
AA	3	4,500	8	9,127
BO ¹	1	2,380	5	5,200
BO ^{1v}	2	1,890	5	3,813
BO ²	1	0,140	0	0,217
AB	3	2,100	3	3,207
BB	0	0,245	0	0,282
Total	50,0	50,0	150,0	150,0

Tabla 11. Número observado y esperado de genotipos ABO para cada población.

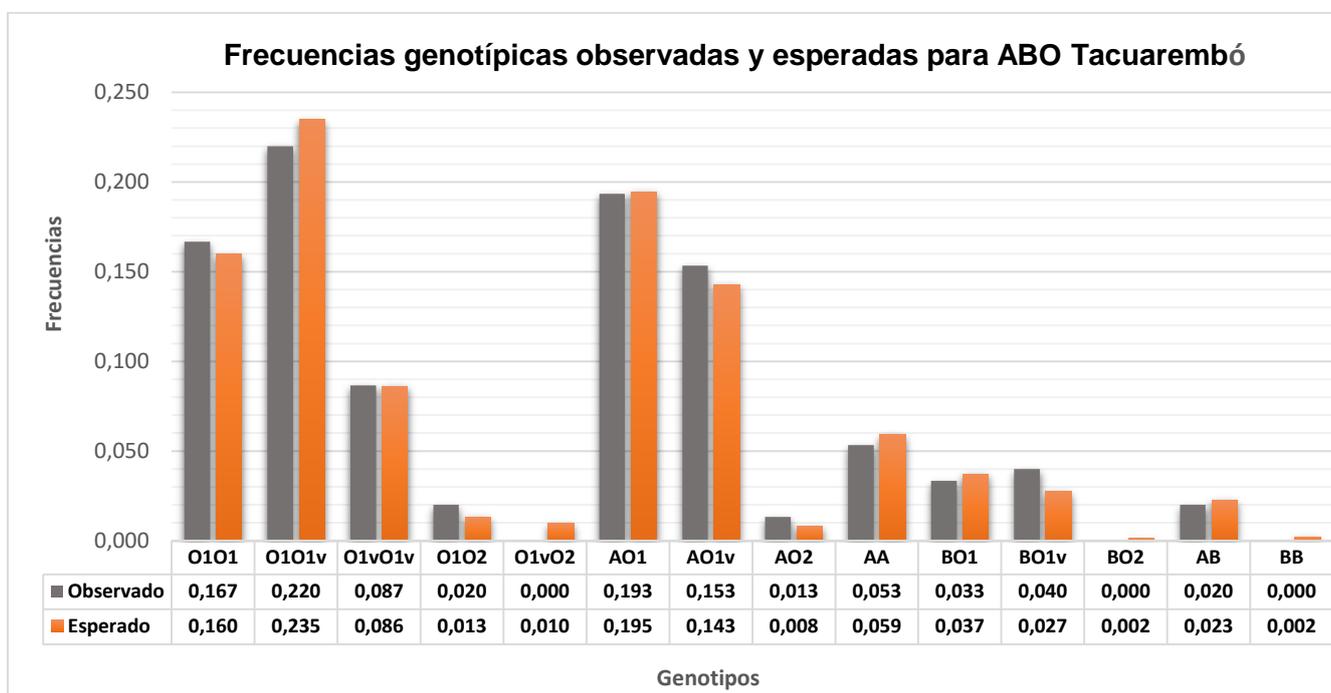


Figura 13. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para el sistema ABO en Tacuarembó.

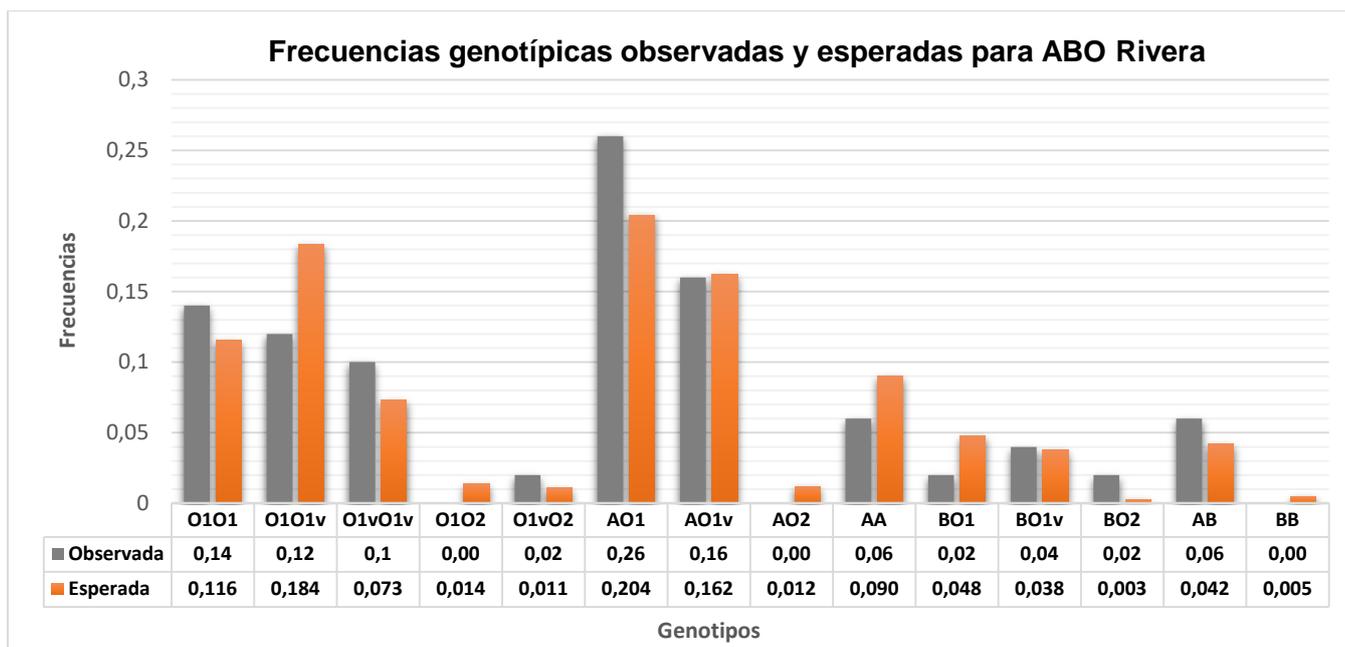


Figura 14. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para el sistema ABO en Rivera.

A su vez las frecuencias fenotípicas y alélicas de Tacuarembó y Rivera se visualizan en la Tabla 12. En estas se puede observar que el fenotipo más frecuente para Tacuarembó fue el grupo O=0,493 y para el caso de Rivera predominó el A=0,480, mientras que en conjunto el grupo O fue el más abundante con valores de 0,465. Dentro del grupo O, la variante O¹ alcanzó las mayores frecuencias promedios (0,385), seguido por el O^{1v} (0,288) y O² (0,018). Siendo las diferencias entre ambos departamentos no significativas para las 5 variantes alélicas ($X^2=2,6$; $gl=4$; $p=0,62$).

Fenotipo	Tacuarembó	Rivera	Alelo	Tacuarembó	Rivera	Noreste
A	0,413	0,480	A	0,243	0,300	0,258
B	0,073	0,080	B	0,047	0,070	0,053
AB	0,020	0,060	O¹	0,400	0,340	0,385
O	0,493	0,380	O^{1v}	0,293	0,270	0,288
TOTAL	1,000	1,000	O²	0,017	0,020	0,018

Tabla 12. Cálculo de frecuencias fenotípicas y alélicas de Tacuarembó, Rivera y conjuntas (Noreste).

4.2.2. Sistema Diego

Ambas muestras se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, para el caso de Tacuarembó ($X^2=0,113$; $gl=1$; $p=0,737$) y Rivera ($X^2=0,087$; $gl=1$; $p=0,768$). En la figura 15 se pueden visualizar las frecuencias genotípicas esperadas y observadas para ambos departamentos.

Las frecuencias alélicas, para Tacuarembó fueron: $D_i^*B=0,973$ y $D_i^*A=0,027$, muy similares a las de Rivera $D_i^*B=0,96$ y $D_i^*A=0,04$ siendo dicha diferencia no significativa ($X^2=0,11$; $gl=1$; $p=0,62$).

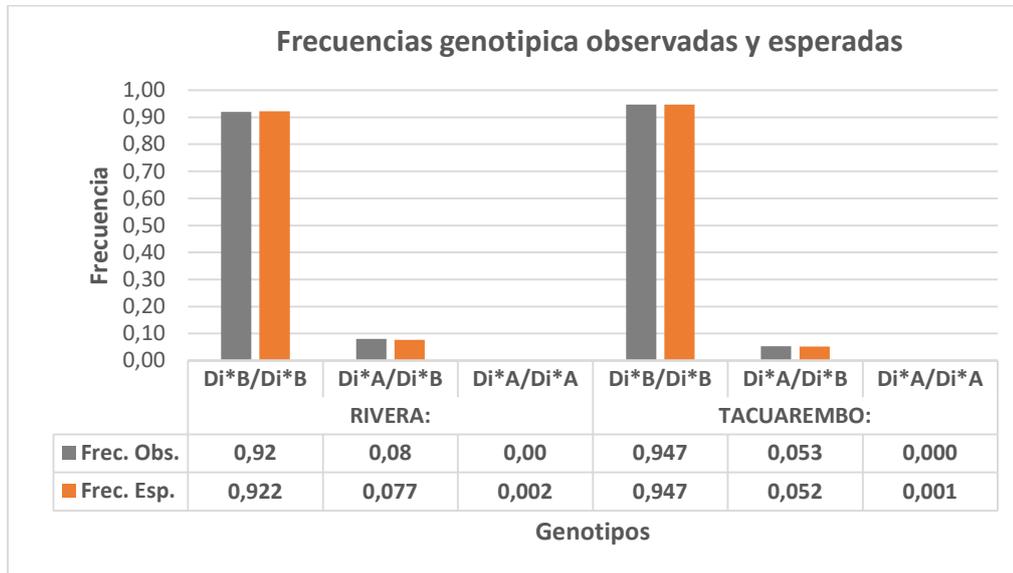


Figura 15. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para el sistema Diego en los departamentos de Tacuarembó y Rivera.

4.2.3. Sistema Duffy

Ambas muestras se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, para el caso de Tacuarembó ($X^2=0,029$; $gl=1$; $p=0,864$) y para Rivera ($X^2=0,494$; $gl=1$; $p=0,482$). En la Figura 16 se pueden visualizar las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas para cada muestra, pero no se descarta que algunos fenotipos $F_y(a+b+)$ o $F_y(a-b+)$ puedan tener un alelo nulo e incluso aparecer algún individuo homocigoto $F_y(a-b-)$. Como se mencionó anteriormente no se pudo determinar el alelo nulo (FY^{*ES}) por PCR y en relación a ellos tampoco las frecuencias genotípicas ni alélicas reales para el total de las muestras. Pero se puede afirmar que en Tacuarembó, el alelo F_y^*A alcanzó una frecuencia de 0,443 y F_y^*B más FY^{*ES} 0,557, mientras que en Rivera para F_y^*A fue 0,490 y F_y^*B más FY^{*ES} 0,510. Diferencias que no son significativas ($X^2=0,48$; $gl=1$; $p=0,488$) y que nos permitiría considerar a ambas muestras como una sola.

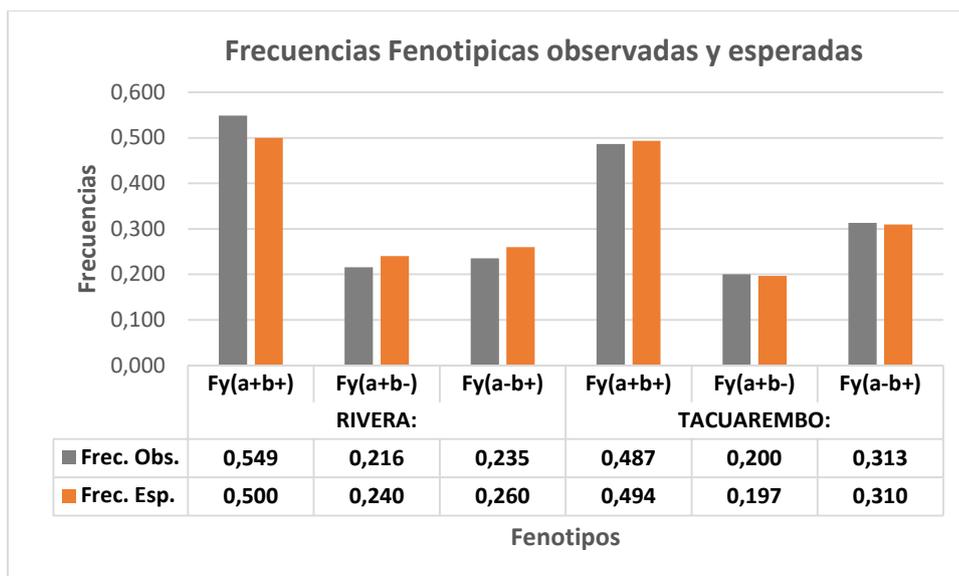


Figura 16. Frecuencias fenotípicas observadas y esperadas para el sistema Duffy en los departamentos de Tacuarembó y Rivera.

Por su parte a partir de los datos de “Axiom Spain” se analizó el rs 2814778, donde un cambio de una timina (T) por una citosina (C) determina el alelo FY^{*ES} . En la submuestra de 16 individuos de Tacuarembó el alelo FY^{*ES} se encontró en 3 ellas y para la submuestra de Rivera en 2 de 25 donadores, en ambos casos en heterocigosis. Valores que determinarían una frecuencia del alelo nulo de 0,0937 en Tacuarembó y 0,040 en Rivera, lo que llevado a la muestra total resulta en una probabilidad de encontrar 1 individuo con el fenotipo nulo y ninguno respectivamente. Cuando comparamos los individuos portadores de este alelo con las entrevistas solo uno de ellos reconocía ascendencia africana, resultado que coincidía también con su ADN mitocondrial.

4.3. AMOVA

Al igual que los resultados anteriores el test de significación revela la ausencia de diferenciación significativa entre las muestras de Tacuarembó y Rivera ($p=0,553$), para un índice de fijación (F_{st}) de $-0,0022$. Resultado que confirma que la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la región es homogénea, y el valor tan próximo a cero indicaría su gran similitud y nos permitiría analizarlas ambas muestras en conjunto. Es importante aclarar que los valores de F_{st} varían entre 0 (subpoblaciones idénticas) y 1 (fijación de alelos alternativos), pero en ocasiones, a causa de tamaños muestrales desiguales (en este caso 150 y 50), pueden aparecer ligeros valores negativos (Lowe et al., 2004).

De manera complementaria, el AMOVA también proporcionó otros estadísticos F que son de interés para los objetivos de este trabajo. El índice de endogamia local (Fis), que mide el aumento de homocigosis debido a apareamientos consanguíneos, es de -0,0019 con un valor p de 0,931, lo que sugiere apareamiento al azar (panmixia). El coeficiente de endogamia total de la región (Fit) es de -0,0041 (p= 0,562) y también muestra un valor no significativo.

En cuanto a la heterocigosidad media para todos los sistemas fue de 0,413 la observada y 0,414 la esperada en Tacuarembó, mientras que en Rivera se obtuvieron valores de 0,440 y 0,435 respectivamente, a continuación en la Tabla 13 se puede observar los datos para cada sistema según departamento y en su conjunto (Noreste).

Poblacion	ABO		DIEGO		DUFFY	
	Het. Obs	Het. Esp	Het. Obs	Het. Esp	Het. Obs	Het. Esp
Tacuarembó	0,697	0,700	0,053	0,052	0,489	0,495
Rivera	0,694	0,723	0,080	0,077	0,540	0,505
Noreste	0,697	0,694	0,053	0,052	0,490	0,496

Tabla 13. Heterocigosidad. Heterocigosidad observada (Het. Obs) y heterocigosidad esperada (Het. Obs) en Tacuarembó, Rivera y la región noreste para cada uno de los sistemas.

4.4. Distancias genéticas con otras poblaciones

Pese a que las diferencias entre Rivera y Tacuarembó no fueron estadísticamente significativas, se prefirió trabajar ambas muestras por separado ya que nos interesaba visualizar diferencias no reflejadas en los análisis anteriores.

4.4.1. Sistema ABO

Las muestras de las 2 poblaciones del Noreste uruguayo se compararon con otras 14 poblaciones mundiales, distribuidas en 4 continentes incluyéndose nuestros países vecinos (Argentina y Brasil). Las frecuencias de estas se presentan en la Tabla 14 y los análisis estadísticos multivariados de agrupación de clústeres mediante dendrograma en la Figura 17.

Continente	Población	Abrev.	Nº	A	B	O1	O1v	O2	Bib.
EUROPA	Península Ibérica	PI	440	0,33	0,08	0,37	0,21	0,01	1
	Islas Canarias	IC	508	0,26	0,08	0,37	0,28	0,01	2
	Zamora (España)	Zam	108	0,29	0,09	0,32	0,26	0,04	3
	Londres (Inglaterra)	Lon	98	0,21	0,13	0,41	0,24	0,01	4
	Bolonia (Italia)	Ita	60	0,28	0,12	0,41	0,18	0,02	5
	Polonia	Pol	170	0,26	0,17	0,40	0,15	0,02	6
AFRICA	Mauritania	Mau	60	0,18	0,13	0,33	0,33	0,02	7
	Bereberes	Ber	84	0,23	0,11	0,31	0,33	0,02	8
	Marruecos	Mar	138	0,22	0,15	0,36	0,25	0,02	9
ASIA	Japón	Jap	520	0,29	0,18	0,27	0,26	0,00	10
AMERICA	San Pablo	SP	324	0,25	0,10	0,44	0,17	0,04	11
	Argentina	Arg	578	0,20	0,05	0,41	0,32	0,02	12
	Montevideo	Mdeo	50	0,31	0,07	0,39	0,22	0,01	13
	Indígena	Ind	---	0,00	0,00	0,27	0,73	0,00	14
	Tacuarembó	Tbo	150	0,24	0,05	0,40	0,29	0,02	--
	Rivera	Riv	50	0,30	0,07	0,34	0,27	0,02	--

Tabla 14. Frecuencias alélicas poblacionales para el sistema ABO. Datos de 14 poblaciones mundiales distribuidas en cuatro continentes y las dos muestras estudiadas. Bibliografía: 1, 7, 8 y 9 (Fregel et al. 2009), 2 (Fregel et al. 2005), 3 y 6 (Umbria et al., 2014), 4 (Yip, 2000), 5 (Ferri et al., 2006), 10 (Kang et al., 1997), 11 (Mattos et al., 2001), 12 compilado de 7 provincias (Vaccaro, 2017), 13 (Acosta, 2015), 14 compilado de poblaciones indígenas americanos (Parolin et al., 2013).

Para analizar el dendrograma se trazó una línea horizontal de modo de determinar el número de clústeres en que se dividió el conjunto de poblaciones, siendo esta decisión subjetiva. Se observa que Tacuarembó se agrupa con Islas Canarias y a su vez más alejado de Argentina (7 provincias). Rivera por su parte lo hace directamente con Zamora (España), pero próxima a Península Ibérica y Montevideo que mapean juntos. A su vez si tomamos el corte establecido todas las poblaciones anteriormente mencionadas se encuentran en un único clúster, pero de mover ligeramente la línea de referencia, podrían incluso ser dos clústeres. Bolonia (Italia) y Londres (Inglaterra) mapean junto y se encuentran en el mismo clúster que Polonia y San Pablo (Brasil). Por su parte las poblaciones africanas de mauritanos, bereberes y marroquíes forman otro clúster. Todas las poblaciones se diferencian de Japón y más aún del conglomerado de las poblaciones indígenas que fue eliminado del dendrograma por reducir la visibilidad, pero se puede decir que mapeó separado del resto de poblaciones a una distancia de 0,55, aunque cabe mencionar que no

existen datos de poblaciones indígenas representativas de nuestro país y se usaron frecuencias generales.

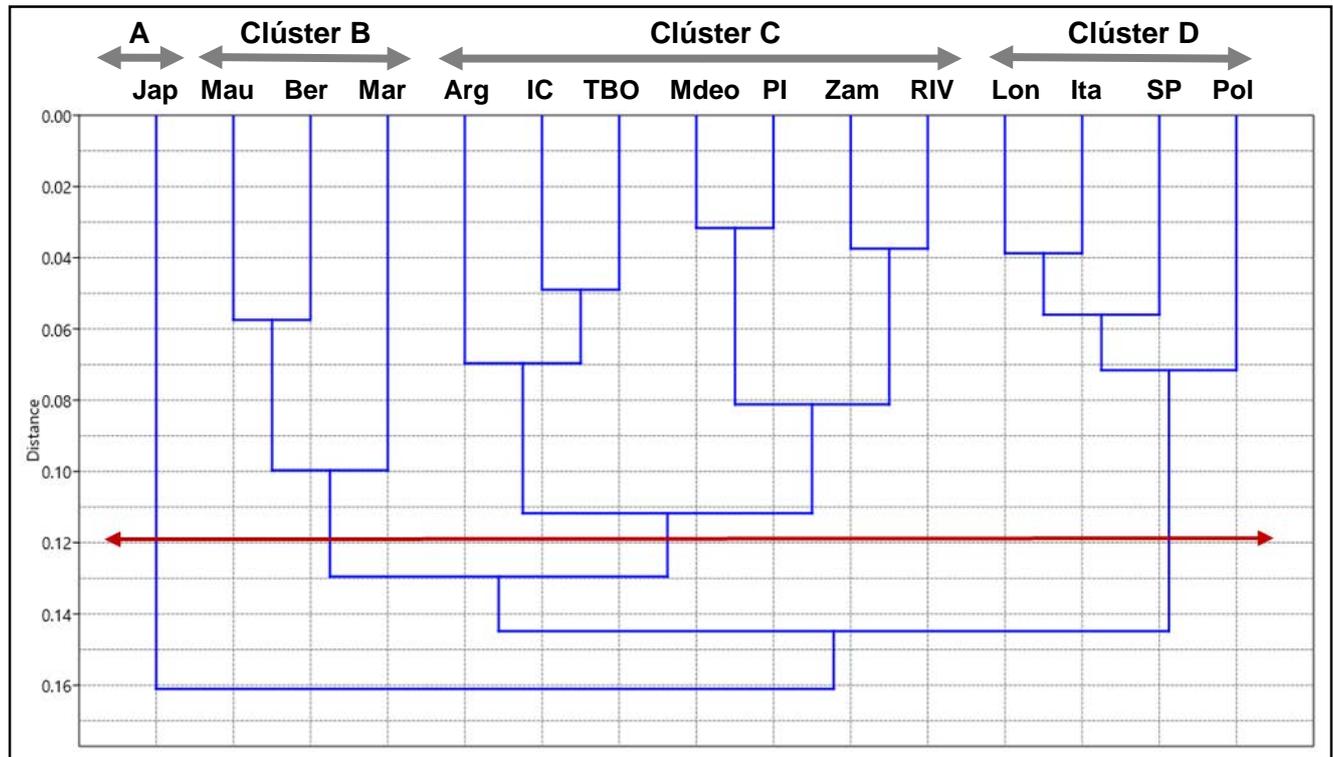


Figura 17. Dendrograma UPGMA a partir de frecuencias poblacionales del sistema ABO. Este se realizó en PAST, pero la línea horizontal de corte que permitió la formación de los 4 clústeres para las 15 poblaciones se trazó a criterio del investigador.

En la Figura 18 se visualizan los índices F_{st} de todas las poblaciones, en estas salvo la población indígena que mantiene diferencias moderadas a grandes (valores mínimos de 0,13 y máximos de 0,22), el resto de las poblaciones se caracterizan por tener una diferenciación pequeña (0-0,05) entre ellas. En el caso de Tacuarembó mantiene diferencias significativas con Polonia, San Pablo, Japón y la población indígena, mientras que Rivera solamente con la población indígena.

	PI	IC	Zom	Lon	Bol	Pol	Mau	Ber	Mar	Jap	SP	Arg	Mdeo	TBO	RIV	Ind
PI	0.00000															
IC	0.00481	0.00000														
Zom	-0.0004	-0.0027	0.00000													
Lon	0.00703	-0.0008	0.00022	0.0000												
Bol	-0.0049	-0.0000	-0.0029	-0.0073	0.0000											
Pol	0.00863	0.01451	0.01000	0.00094	-0.0079	0.0000										
Mau	0.01929	-0.0002	-0.0005	-0.0037	0.00991	0.02030	0.0000									
Ber	0.01449	-0.0009	-0.0039	0.00144	0.01060	0.02372	-0.0123	0.0000								
Mar	0.00913	0.00056	-0.0015	-0.0073	-0.0033	0.00358	-0.0061	-0.0020	0.0000							
Jap	0.01476	0.01272	0.00258	0.01215	0.01148	0.01709	0.00648	0.00461	0.00613	0.00000						
SP	0.00739	0.01038	0.00996	0.00051	-0.0078	0.00106	0.02109	0.02358	0.00651	0.02929	0.00000					
Arg	0.02061	0.00391	0.00954	0.00353	0.01264	0.03008	0.00053	0.00359	0.00753	0.03187	0.01817	0.0000				
Mdeo	-0.0097	-0.0067	-0.0097	-0.0076	-0.0160	-0.0027	0.00416	0.00209	-0.0044	0.00797	-0.0062	0.00462	0.0000			
TBO	0.00771	-0.0023	0.00009	-0.0008	0.00196	0.01945	0.00015	0.00029	0.00271	0.02188	0.00941	-0.0023	-0.0060	0.0000		
RIV	-0.0059	-0.0090	-0.0140	-0.0041	-0.0068	0.00826	-0.0054	-0.0094	-0.0050	-0.0005	0.00655	0.00228	-0.0150	-0.0070	0.0000	
Ind	0.21488	0.15999	0.18399	0.18826	0.24535	0.24471	0.13386	0.13576	0.17478	0.17959	0.22525	0.13333	0.22913	0.16049	0.1911	0.000

Figura 18. Valores de Fst para el sistema ABO. Estos se obtenidos en Arlequin, en azul se indican aquellos con valor p significativo.

4.4.2. Sistema Diego

Las muestras de las 2 poblaciones estudiadas se compararon con otras 15 poblaciones mundiales, distribuidas en 4 continentes. Las frecuencias de estas se presentan en la Tabla 15, el Dendrograma UPGMA en la Figura 19 y los índices Fst en la 20.

Continente	Población	Abrev.	Nº	Di*A	Di*B	Bibliografía
EUROPA	Italia	Ita	400	0,000	1,000	Zafar y Reid, 1993
	España	Esp	400	0,000	1,000	Zafar y Reid, 1993
	Holanda	Hol	200	0,000	1,000	Zafar y Reid, 1993
AFRICA	Etiopia	Eti	145	0,000	1,000	Mourant et al., 1976
	Kenia	Ken	136	0,000	1,000	Mourant et al., 1976
	Liberia	Lib	666	0,000	1,000	Mourant et al., 1976
ASIA	China	Chi	1766	0,036	0,964	Wuet al., 2002
	Japón	Jap	1022	0,043	0,957	Delaney et al., 2015
	Corea	Cor	1033	0,058	0,942	Delaney et al., 2015
AMERICA	Amazonia Perú	Ama	76	0,086	0,914	Acosta et al., 2014
	México ciudad	Mex	247	0,085	0,915	Arregue-Avila, 2011
	Argentina (Esquel)	Arg	59	0,027	0,973	Avena et al., 2010
	Brasil	Bra	4326	0,018	0,982	Novaretti et al., 2010
	Sur de Brasil	SBra	373	0,028	0,972	Costa et al., 2016
	Uruguay (TBO)	Uru	121	0,008	0,992	Sans, 1994
	Rivera	RIV	50	0,040	0,960	Este estudio
Tacuarembó	TBO	150	0,027	0,973	Este estudio	

Tabla N° 15. Frecuencias alélicas poblacionales para el sistema Diego. Datos de 15 poblaciones mundiales distribuidas en cuatro continentes y las dos muestras estudiadas.

Al igual que en el caso anterior para analizar el dendrograma se trazó una línea horizontal para determina el número de clústeres en que se divide el conjunto de poblaciones. Las muestras estudiadas si bien se agruparon en el mismo clúster se diferenciaron entre ellas, Tacuarembó se agrupó con Argentina (con quien no presenta diferencias en sus frecuencias) y con Brasil, diferenciándose mínimamente del sur de este, mientras que Rivera al presentar una mayor frecuencia del alelo DI*A se agrupó con los países asiáticos (Japón y China). Uruguay (otro estudio en Tacuarembó) por su baja frecuencia de DI*A se agrupó con las poblaciones europeas y africanas que carecen de este alelo. Ciudad de México y la Amazonia de Perú se diferenciaron en gran medida del resto por su alta frecuencia del alelo DI*A.

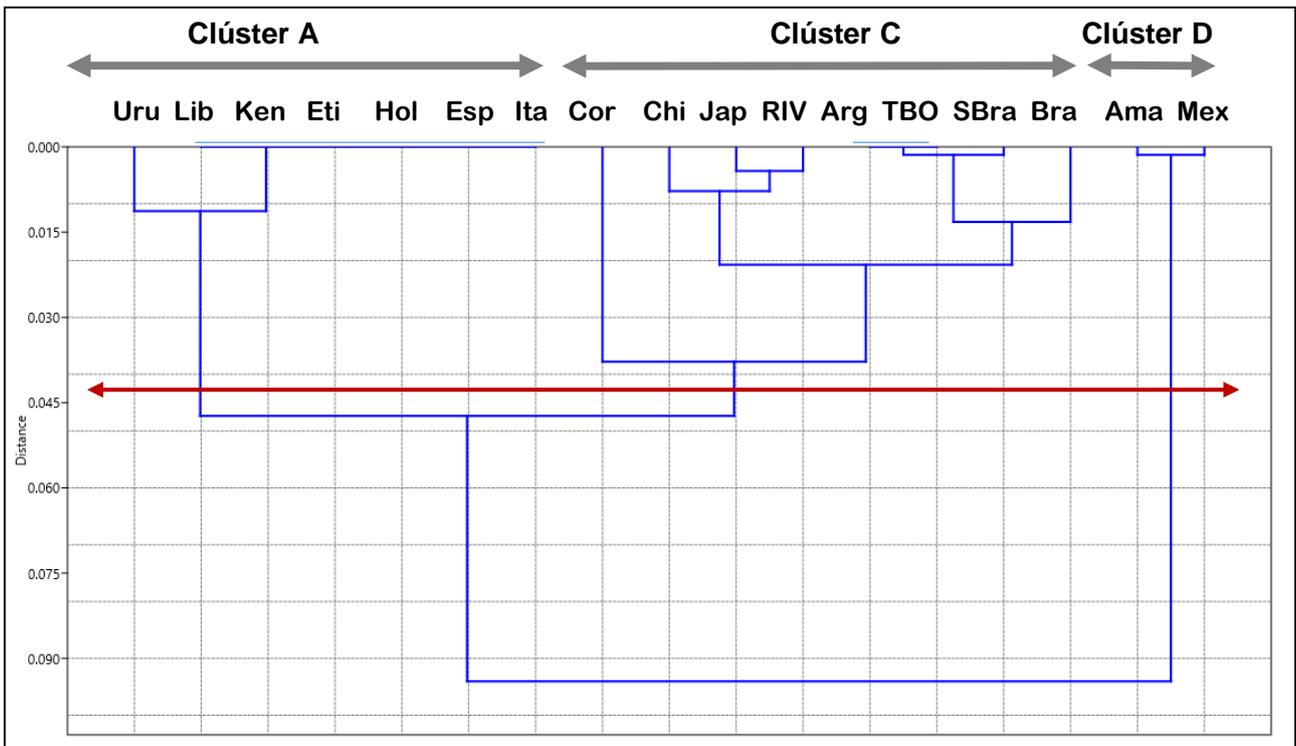


Figura 19. Dendrograma UPGMA a partir de frecuencias poblacionales para el sistema Diego. Este se realizó en PAST pero la línea horizontal de corte que permitió la formación de los 3 clústeres para las 17 poblaciones se trazó a criterio del investigador.

En la Figura 20 se visualizan los índices F_{st} de todas las poblaciones y con el color azul se indican aquellas que tienen diferencias significativas. Para las poblaciones europeas y africanas el F_{st} es de 0 entre ellas, por tener frecuencias idénticas (100% alelo DI*B). A

modo general se puede afirmar que todas las poblaciones tienen diferencias pequeñas (0-0,05), salvo Amazonia (que presenta diferencias moderadas, grandes y muy grandes) y México (donde las diferencias son moderadas) con las poblaciones de Europa y África. Los países asiáticos muestran diferencias pequeñas pero significativas con los del continente europeo y africano, mientras que Rivera presenta diferencias moderadas y significativas con España, Italia, Holanda y Libia. Tacuarembó por su parte se caracteriza por tener diferencias pequeñas con todas las poblaciones y ser significativas en las mismas poblaciones que Rivera, pero también con México y la región amazónica de Perú, situación similar a la del sur de Brasil y Argentina.

	Ita	Esp	Hol	Eti	Ken	Lib	Chi	Jap	Cor	Ama	Mex	Arg	Bra	SBra	Uru	RIV	TBO
Ita	0.000																
Esp	0.0000	0.000															
Hol	0.0000	0.0000	0.000														
Eti	0.0000	0.0000	0.0000	0.000													
Ken	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.000												
Lib	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.000											
Chi	0.0210	0.0210	0.0178	0.0163	0.0160	0.0242	0.000										
Jap	0.0286	0.0286	0.0233	0.0212	0.0208	0.0346	-0.000	0.000									
Cor	0.0393	0.0393	0.0326	0.0302	0.0297	0.0470	0.0048	0.0013	0.000								
Ama	0.2357	0.2357	0.1480	0.1198	0.1149	0.3273	0.0341	0.0197	0.0031	0.000							
Mex	0.1055	0.1055	0.0733	0.0635	0.0618	0.1442	0.0265	0.0154	0.0036	-0.008	0.000						
Arg	0.0434	0.0434	0.0252	0.0195	0.0185	0.0656	-0.002	-0.000	0.0058	0.0355	0.0231	0.000					
Bra	0.0084	0.0084	0.0068	0.0058	0.0055	0.0095	0.0070	0.0136	0.0314	0.1231	0.0963	-0.0013	0.000				
SBra	0.0251	0.0251	0.0168	0.0140	0.0134	0.0347	-0.000	0.0017	0.0085	0.0490	0.0319	-0.0046	0.00067	0.000			
Uru	0.0123	0.0123	0.0043	0.0015	0.0009	0.0216	0.0073	0.0112	0.0198	0.0762	0.0450	0.00185	-0.0015	0.00237	0.000		
RIV	0.1492	0.1492	0.0832	0.0627	0.0592	0.1228	-0.010	-0.010	-0.007	0.0037	0.0021	-0.0104	0.00351	-0.0082	0.0148	0.000	
TBO	0.0434	0.0434	0.0252	0.0195	0.0185	0.0456	-0.002	-0.000	0.0058	0.0355	0.0231	-0.0067	-0.0013	-0.0046	0.0018	-0.0104	0.000

Figura 20. Valores de Fst para el sistema Diego. Obtenidos en Arlequín, en azul se indican aquellos con valor p significativo.

4.4.3. Sistema Duffy

Las frecuencias poblacionales de Tacuarembó y Rivera se compararon con otras 15 poblaciones mundiales, distribuidas en 4 continentes (Tabla 16); los análisis estadísticos multivariados de agrupación de clústeres mediante dendrograma y Fst se visualizan en las Figuras 21 y 22 respectivamente.

Continente	Población	Abrev.	Nº	FY*A	FY*B+ FY*ES	Bibliografía
EUROPA	Portugal	Por	301	0,370	0,630	Mourant et al., 1976
	España	Esp	97	0,40	0,6	Mourant et al., 1976
	Inglaterra	Ing	1166	0,413	0,587	Mourant et al., 1976
	Suiza	Sui	100	0,41	0,59	Olsson et al., 1998
AFRICA	Congo (Bantu)	Con	501	0,04	0,96	Mourant et al., 1976
	Kenia	Ken	84	0,012	0,988	Mourant et al., 1976
	Bereberes (Argelia)	Ber	82	0,2	0,8	Mourant et al., 1976
	Pinetown (Sudáfrica)	Pin	100	0,03	0,97	Olsson et al., 1998
ASIA	China	Chi	566	0,940	0,060	Zhou et al., 2014
	Japón (Tokio)	Jap	135	0,878	0,122	Mourant et al., 1976
	Corea	Kor	107	0,921	0,079	Nathalang et al 2015
AMERICA	México (ciudad)	Mex	403	0,543	0,457	Arreygue-Avila, 2011
	Argentina (Rosario)	Arg	275	0,51	0,49	Cotorruelo et al., 2009
	Brasil (Amazonia)	Am.Bra	494	0,365	0,635	Cavasini et al., 2007 y Schneider et al., 2012
	Uruguay	Uru	82	0,394	0,606	Sans, 1991
	Tacuarembó	TBO	150	0,443	0,557	Este estudio
	Rivera	RIV	50	0,490	0,510	Este estudio

Tabla 16. Frecuencias alélicas poblacionales para el sistema Duffy. Dato para 15 poblaciones mundiales distribuidas en cuatro continentes y las dos muestras estudiadas.

Para el análisis del dendrograma (Figura 21) se utilizó el mismo criterio que en los casos anteriores y se trazó una línea horizontal determinándose 3 clústeres. El primer clúster está conformado por las poblaciones europeas y americanas, pero en este el departamento de Rivera se agrupó a muy poca distancia de Argentina y México, mientras que Tacuarembó es más similar a Portugal, España, Inglaterra, Suiza, la Amazonia brasilera y la muestra uruguaya analizada por Sans (1991). Las poblaciones de África forman un agrupamiento en el cual los Bereberes del norte de ese continente se diferencian del resto y las asiáticas se agrupan entre sí y son las que mayor grado de diferenciación presenta con el resto.

Los índices F_{st} (Figura 22) muestran la misma tendencia que el dendrograma, donde se puede observar una clara diferenciación del sistema Duffy entre continentes. Las poblaciones africanas y asiáticas presentan una diferencia pequeña entre los países que componen a cada una de ellas, pero en general grande a muy grande al compararse con otras poblaciones. Las europeas y americanas son similares entre sí, pero también presentan diferencias grandes a muy grandes y a su vez significativas con el resto. Tacuarembó y Rivera siguen la misma tendencia, presentando en general diferencias

significativas y muy grandes con los países de África y Asia, pero para el caso de Tacuarembó también se observa una diferencia pequeña pero significativa con México.

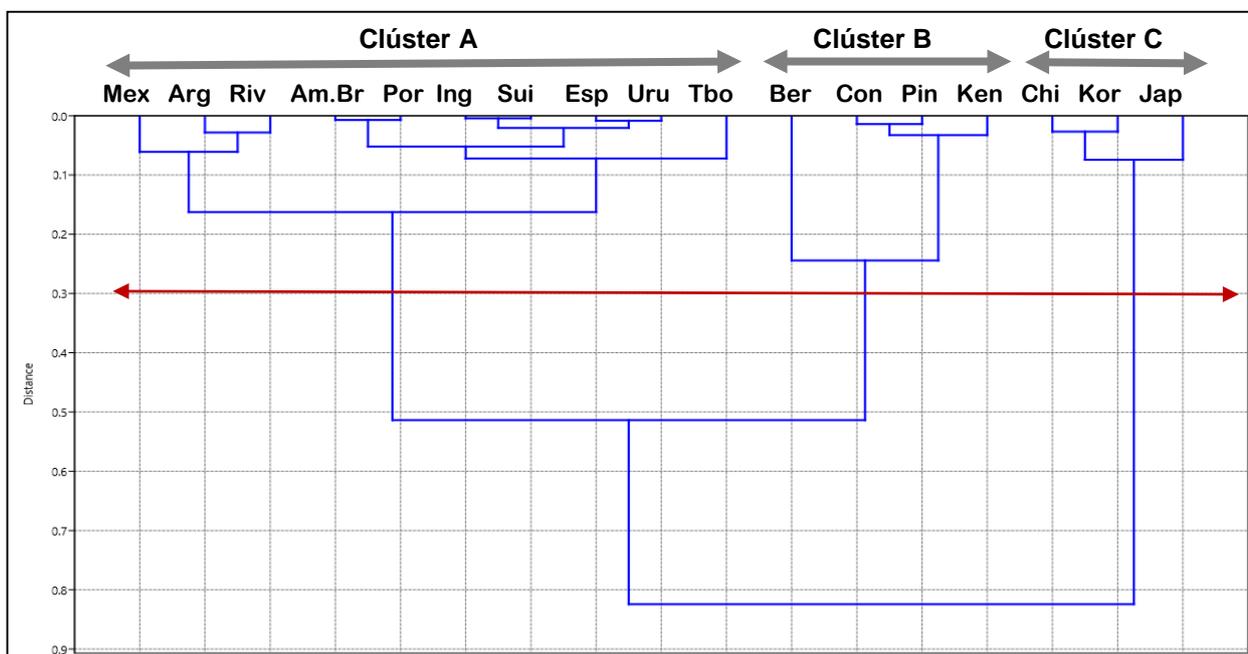


Figura 21. Dendrograma UPGMA a partir de frecuencias poblacionales del sistema Duffy. Este se realizó en PAST pero la línea horizontal de corte que permitió la formación de los 3 clústeres para las 17 poblaciones se trazó a criterio del investigador.

	Por	Esp	Ing	Sui	Con	Ken	Ber	Pin	Chi	Jap	Kor	Mex	Arg	Am.Br	Uru	TBO	RIV
Por	0.0000																
Esp	-0.004	0.0000															
Ing	0.0020	-0.0053	0.0000														
Sui	-0.003	-0.0101	-0.005	0.0000													
Con	0.3252	0.47725	0.2769	0.4843	0.0000												
Ken	0.2512	0.35458	0.2582	0.3597	0.0043	0.0000											
Ber	0.0579	0.08546	0.0858	0.0917	0.1742	0.1571	0.0000										
Pin	0.2349	0.33529	0.2422	0.3410	-0.004	-0.003	0.1261	0.0000									
Chi	0.5799	0.63285	0.4320	0.6233	0.8939	0.8943	0.7995	0.8873	0.0000								
Jap	0.4020	0.41088	0.3221	0.4003	0.8707	0.8444	0.6512	0.8321	0.0208	0.0000							
Kor	0.4460	0.47090	0.3625	0.4599	0.8992	0.9037	0.7098	0.8883	-0.003	0.0023	0.0000						
Mex	0.0566	0.03284	0.0319	0.0288	0.4890	0.4016	0.2014	0.3885	0.3646	0.2085	0.2531	0.0000					
Arg	0.0359	0.01580	0.0162	0.0127	0.4913	0.3846	0.1711	0.3713	0.4352	0.2515	0.2986	-0.000	0.0000				
Am.Br	-0.002	-0.0031	0.0035	-0.001	0.2801	0.2325	0.0543	0.2163	0.5444	0.3930	0.4343	0.0607	0.0394	0.0000			
Uru	-0.006	-0.0110	-0.005	-0.010	0.4774	0.3591	0.0766	0.3376	0.6538	0.4324	0.4958	0.0385	0.0200	-0.005	0.0000		
TBO	0.0056	-0.0055	-0.002	-0.006	0.4793	0.3552	0.1142	0.3397	0.5634	0.3477	0.4007	0.0166	0.0043	0.0077	-0.004	0.0000	
RIV	0.0142	-0.0028	-0.001	-0.005	0.6250	0.5140	0.1610	0.4894	0.5919	0.3511	0.4311	-0.003	-0.010	0.0172	0.0002	-0.0102	0.0000

Figura 22. Valores de Fst para el sistema Duffy. Obtenidos en Arlequín, en azul se indican aquellos con valor p significativo.

4.4.4. Distancia genética para los tres sistemas de estudio y sus poblaciones parentales según prestador de salud

Debido a que encontrar frecuencias para los sistemas en estudio en las mismas poblaciones no fue posible, se realizó un compilado de las frecuencias de las poblaciones parentales de modo de contrastar dichos datos con los de las poblaciones en estudio (para el sistema Duffy se incorporó el alelo nulo) mediante PCoA. Dichas frecuencias se presentan en la Tabla 17.

Alelo	A	B	O1	O1V	O2	FY*A	FY*B	FY*ES	DI*A	DI*B
EROPEO	0,270	0,100	0,400	0,230	0,020	0,394	0,598	0,004	0,000	1,000
AFRICANO	0,210	0,130	0,340	0,310	0,020	0,050	0,050	0,900	0,000	1,000
INDIGENA	0,020	0,000	0,370	0,610	0,000	0,775	0,225	0,000	0,126	0,876
RIVERA MUT	0,262	0,095	0,310	0,286	0,048	0,450	0,479	0,071	0,050	0,950
RIVERA ASSE	0,310	0,052	0,364	0,276	0,000	0,520	0,448	0,028	0,030	0,970
RIVERA GEN	0,300	0,070	0,340	0,270	0,020	0,490	0,470	0,040	0,040	0,960
TBO MUT	0,250	0,083	0,383	0,250	0,033	0,417	0,472	0,111	0,017	0,983
TBO ASSE	0,205	0,023	0,523	0,250	0,000	0,432	0,497	0,071	0,045	0,955
TBO GEN (50)	0,240	0,058	0,433	0,250	0,019	0,433	0,473	0,094	0,030	0,970
TBO GEN (150)	0,243	0,047	0,400	0,290	0,017	0,443	0,463	0,094	0,027	0,973

Tabla 17. Frecuencia del compilado de poblaciones parentales y de las poblaciones estudiadas según prestador de salud. MUT (mutualistas), ASSE (Administración de los Servicios de Salud del Estado), GEN (población general sin diferenciar prestador de salud). Para el caso de Tacuarembó en las 50 muestras con datos de prestador de salud y en las 150 muestras totales.

En el análisis de PCoA (Figura 23) se observa que las muestras de Rivera y Tacuarembó independientemente del prestador de salud se agrupan juntas, pero Tacuarembó ASSE y Rivera mutualista son las más similares entre sí. A su vez todas se ubican en el mismo cuadrante que la población europea (con quien mantienen mayor distancia), mientras que las indígenas y africanas lo hacen en cuadrantes diferentes pero diferenciándose más esta última.

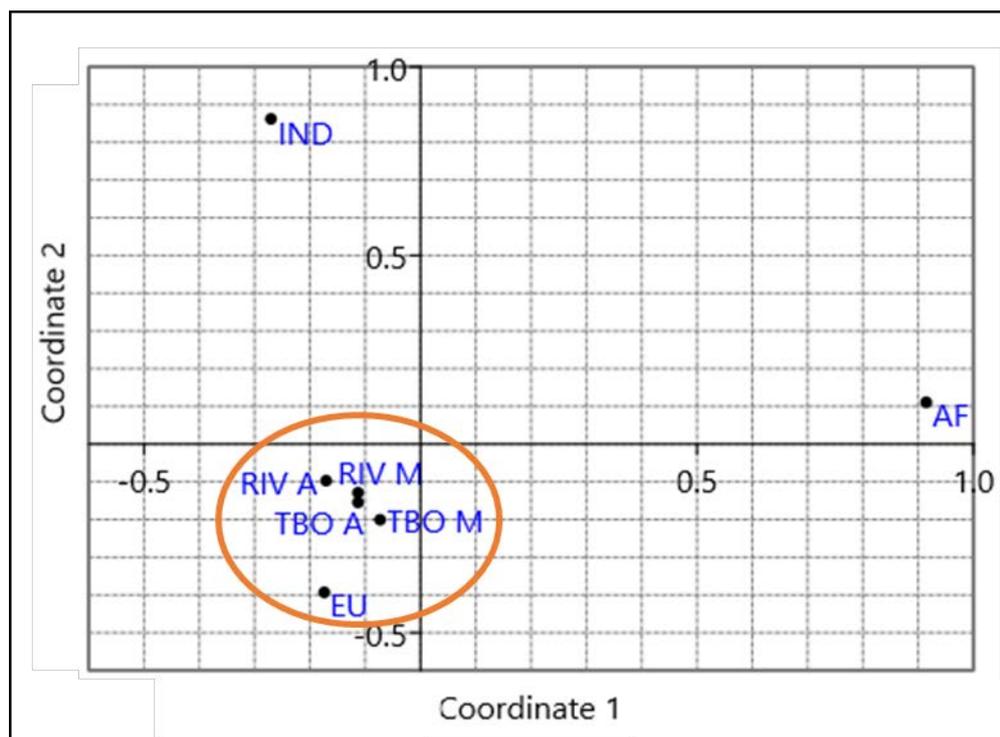


Figura 23. PCoA para 50 muestras de Tacuarembó y 50 muestras de Rivera diferenciadas según prestador de salud. M= Mutualista o IAMC y A= ASSE. RIV= Rivera, TBO= Tacuarembó, EU= Europa, IND= Indígena, AF= Africa.

4.5. Análisis de mezcla genética

A partir de las frecuencias génicas obtenidas (datos de la Tabla 17) se calcularon los aportes europeos, amerindios y africanos mediante el programa ADMIX-95 para cada departamento según prestador de salud y en su conjunto (población general).

Se observó que a modo general ambos departamentos poseen un mayor componente europeo, seguido por indígena americano y en menor proporción africano. Para el departamento de Tacuarembó en la población general (150 muestras) el aporte europeo, indígena y africano fue de 67,2%, 20,3% y 12,5% respectivamente y para las 50 muestras 66%, 25% y 9%. Entre quienes se atendían en ASSE el componente europeo disminuyó a 55,6% y por consiguiente el indígena aumentó a 36,3% ya que el africano apenas varió (8,1%), mientras que en mutualista prevaleció ampliamente la ascendencia europea con 72,25% aumentó la africana a 13,5% y la indígena disminuyó al mínimo encontrado en la región con 14,25%.

En Rivera aumentó la proporción de ancestría indígena (32,1%) a la vez que disminuyó la

europea (64,2%) y africana (3,7%) en comparación con Tacuarembó, con quien también se diferenció porque en ASSE disminuyó el componente indígena a 24,2% y aumentó el europeo a 72,9%; por consiguiente en mutualista el aporte autóctono y el africano alcanzaron valores de 39,8% y 6,3% respectivamente y en el europeo se dieron las mínimas encontradas en la región de estudio con 53,9. Los datos de R^2 (coeficiente de determinación) iguales a 1 son óptimos e indica que el modelo predice perfectamente los valores en el campo de destino.

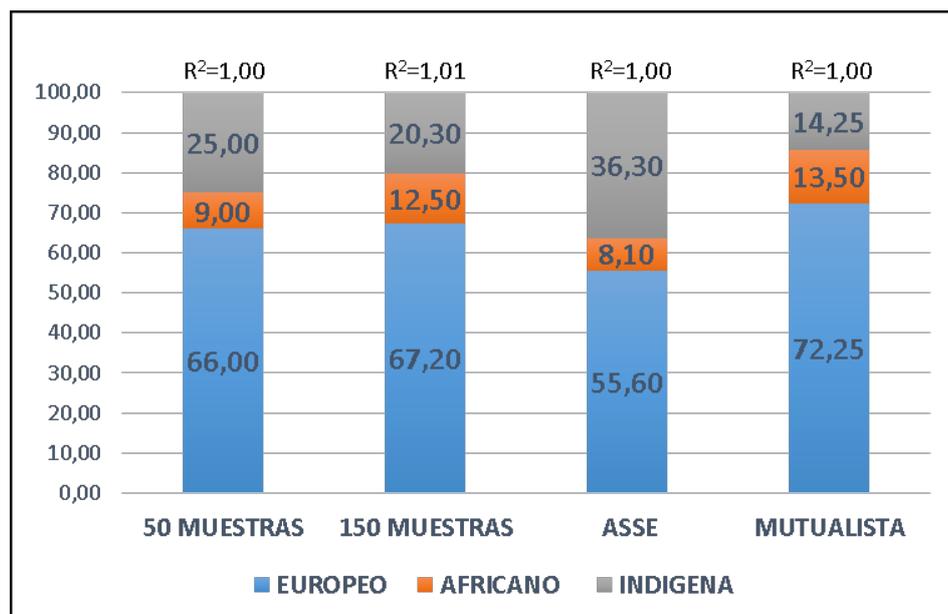


Figura 24. Porcentaje de mezcla génica obtenida para el departamento de Tacuarembó. La muestra general cuenta con dos categorías, las 50 muestras tomadas en 2021, que contaban con datos del prestador de salud y las 150 muestras totales. $R^2 = R.Square$ (Coeficiente de determinación).

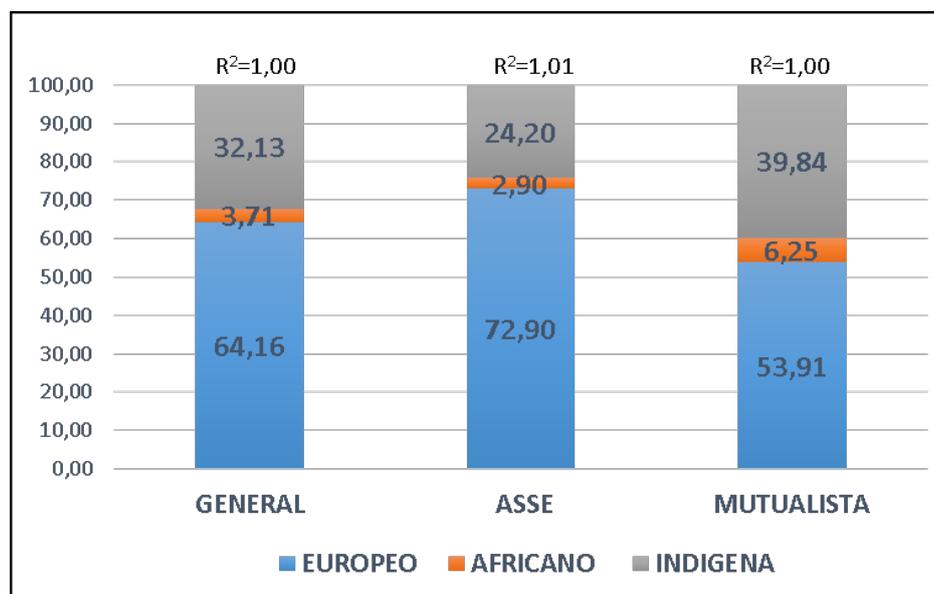


Figura 25. Porcentaje de mezcla génica obtenida para el departamento de Rivera. $R^2 = R.\text{Square}$ (Coeficiente de determinación).

5. Discusión

En relación a los resultados obtenidos y siguiendo el criterio utilizado anteriormente la discusión se dividirá según los análisis individuales para cada uno de los tres sistemas sanguíneos estudiados y finalmente en su conjunto.

5.1. Sistema ABO

Considerando las muestras estudiadas en la presente tesis para el sistema ABO, a nivel fenotípico en Rivera el grupo sanguíneo predominante fue el A con valores de 0,48, mientras que en Tacuarembó fue el O con 0,49. Al comparar los resultados obtenidos para el departamento de Tacuarembó en esta investigación con los de Sans en 1994, se notó que la frecuencia del grupo A fue bastante más alta actualmente que en aquel entonces. Las mayores diferencias se produjeron para una muestra de 127 individuos (mayoritariamente mujeres puérperas del Hospital Regional de Tacuarembó y algunas de sus maridos/parejas); sin embargo esta diferencia y la actual disminución de los otros grupos resultó no ser significativa ($X^2=7,55$, $gl=3$, $p=0,056$) pero está al límite. Para profundizar en este aspecto, se compilaron datos tomados en periodo 1994-1998 en el banco de sangre del Hospital Regional de Tacuarembó (información suministrada por la Dra. Faguaga) y resultó ser similar a la muestra total de Sans (M1=127 más M2=49 individuos seleccionados por tener ancestros presumiblemente indígenas o africanos).

Años	Nº	Fenotipo				Referencia
		O	A	B	AB	
1991-1994 (M1)	127	0,551	0,276	0,137	0,039	Sans, 1994
1991-1994 (M2)	49	0,490	0,490	0,020	0,000	Sans, 1994
1991-1994 Total	176	0,534	0,335	0,102	0,029	Sans, 1994
1994-1998	5809	0,546	0,351	0,078	0,026	Este trabajo, archivo
2017-2021	150	0,493	0,413	0,073	0,020	Este trabajo, muestra

Tabla 18. Frecuencias fenotípicas en diferentes periodos. Con excepción de la muestra del presente trabajo las otras se corresponden a muestras del área de influencia del Hospital Regional de Tacuarembó.

Esta tendencia al aumento del alelo A y disminución de los otros grupos podría estar

indicando que las frecuencias cambiaron en el transcurso de 25-30 años, pero de momento no es estadísticamente significativa. Las razones de estos cambios según Sans y colaboradores (2021) pueden ser diversas, migraciones internas, diferentes comportamientos de distintos sectores de la sociedad (a nivel socioeconómico o geográfico) con relación a la natalidad y mortalidad e incluso factores inherentes a los métodos utilizados. Si podemos afirmar que para nuestra muestra en estudio estos cambios no se deben a procesos migratorios actuales desde otros departamentos o países ya que la muestra consistió en ciudadanos residentes, preferentemente nacidos en el departamento y votantes en las dos últimas elecciones. La principal variación fue en el muestreo, puesto que en el presente estudio se buscó un equilibrio entre personas afiliadas a ASSE y mutualista, mientras que en los otros casos la región seleccionada fue la del área de influencia del Hospital Regional.

En cuanto a las frecuencias alélicas de ambos departamentos, el alelo O fue el más representado y dentro de este lo fue la variante O¹. Tacuarembó se caracterizó por tener un menor porcentaje de los alelos A, B y O² y más del alelo O, tanto de la variante O¹ como O^{1v} predominante en poblaciones indígenas. Lo que podría estar determinando un mayor porcentaje de ascendencia indígena en Tacuarembó, mientras que Rivera presenta más similitudes con la muestra de Montevideo (Acosta 2015). Al comparar las frecuencias obtenidas para ambos departamentos con las poblaciones parentales, se observa mayor similitud con las poblaciones europeas. En Europa aumenta la proporción del alelo A, disminuye el alelo B y la distribución de la variante O¹ es mayor a la del O^{1v}, a diferencia de lo que ocurre en África donde ambas variantes de alelos O se encuentran en proporciones similares, el alelo A es más bajo y el B más alto (Daniels, 2002; Parolin, 2013).

Al comparar la distancia genética de las poblaciones de estudio con otras poblaciones mundiales se puede observar que si bien existen diferencias geográficas según continentes y poblaciones, estas no son tan marcadas en el sistema ABO como para otros grupos sanguíneos. Esto también se evidenció en que los valores de Fst, usados para distinguir la diferenciación entre las poblaciones indicaron diferencias pequeñas (0 a 0,05) entre todas las poblaciones comparadas, a excepción de la indígena sudamericana que presentó diferencias moderadas (0,05 a 0,15) y grandes (0,15 a 0,25) con el resto. Esto se debe a que en general las poblaciones indígenas se caracterizan porque el alelo O está fijado o se encuentra con una frecuencia altamente predominante (Salzano y Callegari-Jacques, 1988). Según diferentes teorías esto se atribuye a que los alelos A y B pudieron estar

ausentes antes de la colonización de América o a que hayan estado presentes pero en frecuencias muy bajas en las primeras poblaciones que llegaron a América y luego se perdieran por la acción de la deriva genética y/o selección natural (Vaccaro, 2017). Otro punto interesante es el de las diferencias entre las variantes del alelo O, diferentes hallazgos indican la mayor frecuencia del alelo O^{1v} en poblaciones indígenas sudamericanas y la ausencia del alelo O² (Llop et al., 2006). Razones por la cual las poblaciones indígenas se diferencian tanto del resto en los índices Fst y en el dendrograma; análisis que indican mayores similitudes entre las poblaciones del noreste uruguayo con Argentina y las españolas, posiblemente porque esta es nuestra principal población parental europea. Lo que puede explicarse debido a que en el siglo XV y XVI los pueblos de la península ibérica inician el periodo de expansión europea por todo el ámbito mundial (Pi Hugarte y Vidart, 1969).

5.2. Sistema Diego

El fenotipo Di(a-b+) fue ampliamente predominante con frecuencias de 0,947 en Tacuarembó y 0,92 en Rivera, seguido por Di(a+b+) con valores de 0,053 y 0,08 respectivamente, no encontrándose individuos para con el fenotipo Di(a+b-). La presencia del alelo DI*A fue mayor en el departamento de Rivera donde alcanzó una frecuencia de 0,04, lo cual determina una mayor similitud con las poblaciones asiáticas e indígenas, mientras que en Tacuarembó la frecuencia fue de 0,027, igual a la población argentina y similares a las reportadas en Brasil (sobre todo el sur). El alelo DI*A es característico de poblaciones asiáticas (frecuencias de 0,02 a 0,12) e indígenas, donde alcanza las máximas frecuencias reportadas, con valores de 0,25 en Quechuas, 0,29 en Caribes, 0,36 en Carajas y 0,46 en Caingangues (Layrisse y Arends, 1958). Su presencia en las actuales poblaciones americanas (trihíbridas) en general es un indicador del aporte aborigen, dado que su prevalencia es nula en las otras poblaciones parentales más comunes. Dichos resultados estarían indicando un mayor componente indígena en Rivera, siendo contrario a los resultados obtenidos para el sistema ABO, pero coherentes con los valores determinados de mezcla génica, lo que se discutirá más adelante. Pero es importante aclarar que las diferencias para dicho sistema no fueron estadísticamente significativas.

Los únicos antecedentes con los que se cuenta para este sistema sanguíneo en Uruguay son los resultados de Sans (1994), quien estimó para el alelo DI*A frecuencias de 0,008 en una muestra de 121 mujeres del Hospital Regional de Tacuarembó, pero diferenciándose

en 0,005 (105 mujeres de la población general) y 0,032 (16 mujeres que reconocieron ascendencia indígena). Cabe mencionar que dichos datos fueron calculados a partir de métodos diferentes: Sans uso técnicas serológicas, mientras que en el presente trabajo, se emplearon procedimientos moleculares.

Debido a la fijación del alelo DI^*B en Europa y África, no se encontraron diferencias de distancia genética entre estas poblaciones y el índice F_{st} fue de cero, pero sí diferencias moderadas con Rivera y pequeñas con Tacuarembó, determinadas por la presencia del alelo DI^*A . La Amazonia peruana y ciudad de México debido a su mayor ascendencia indígena presentaron diferencias significativas con la mayor parte de las poblaciones salvo con algunas asiáticas y Rivera donde la frecuencia de dicho alelo fue intermedio.

5.3. Sistema Duffy

En relación al sistema Duffy se observó a nivel fenotípico para ambas muestras que $Fy(a+b+)$ fue predominante con frecuencias de 0,549 en Rivera y 0,487 en Tacuarembó, seguido por $Fy(a-b+)$ con 0,235 y 0,313 y $Fy(a+b-)$ con 0,216 y 0,197 respectivamente. Mientras que para $Fy(a-b-)$, calculado por estimación, solo se esperaría encontrar un individuo con el fenotipo nulo en Tacuarembó y ninguno en Rivera. En cuanto a las frecuencias alélicas en la muestra de Tacuarembó se determinó una frecuencia FY^*A de 0,440 y FY^*ES de 0,090 mientras que en Rivera fue de 0,490 y 0,040 respectivamente. Debido a esto, al analizar este sistema sanguíneo de forma individual sus frecuencias nos indicarían una menor ascendencia indígena (determinada por la menor frecuencia de FY^*A) y una mayor ascendencia africana (FY^*ES fue poco más que el doble) en Tacuarembó, pero es importante aclarar que las diferencias para dicho sistema fueron no significativas.

Los antecedentes con los que se cuenta son datos serológicos de Sans (1991), para la población de Uruguay predominantemente del sur del país ($Fy^*A=0,394$, $Fy^*B=0,515$ y $Fy^*ES=0,091$) y Sans (1994) en el que se muestrearon 127 individuos mayormente de Tacuarembó, alcanzando FY^*A una frecuencia de 0,382, FY^*B 0,502 y FY^*ES 0,116 (encontrándose 2 individuos con el fenotipo Duffy nulo, lo que es coherente con la actual estimación). Estas frecuencias, en contraste con los datos para los sistemas ABO y Diego muestran menor diferencia con los datos de la actual investigación.

En cuanto a distancias genéticas, se observó una clara diferencia de las poblaciones africanas y asiáticas en comparación a las europeas y americanas que muestran una gran

similitud entre sí. A nivel de F_{st} ambas muestra estudiadas mostraron mayormente diferencias muy grandes con las poblaciones africanas y asiáticas pero diferencias pequeñas con las europeas y americanas. Dicha diferencia también se evidencia claramente en el dendrograma (Figura 21) y se atribuye a que en las poblaciones africanas el alelo nulo alcanza su máxima frecuencia (mayor a 90% e incluso la fijación en partes de África occidental, central y oriental) y en el continente asiático lo hace el alelo FY^*A que está cerca de la fijación en la zona oriental (Howes et al., 2011), siendo este alelo también predominante en poblaciones indígenas donde alcanza valores medios de 77% aproximadamente (Avena et al., 2006). En las poblaciones europeas y americanas actuales la distribución de FY^*A y FY^*B muestra mayor variación en relación a las anteriormente mencionadas y menor variación entre ellas, caracterizándose las americanas por un aporte poco mayor del alelo A debido generalmente a la mezcla con poblaciones indígenas y por tener el alelo FY^{*ES} como consecuencia de la mezcla con poblaciones africanas.

En este sistema el alelo FY^{*ES} es de gran relevancia en la genética de poblaciones ya que en estado homocigoto proporciona uno de los pocos ejemplos conocidos de ventaja selectiva conferida por un fenotipo de grupo sanguíneo a una enfermedad, puesto que atribuye resistencia a la malaria, y explica la alta frecuencia reportada en África (Moulds et al., 1998, Howes et al., 2011); por ello, la incorporación de dicho alelo en las poblaciones americanas actuales está estrechamente vinculada a la ascendencia africana. Sin embargo el hecho de que en el Río de la Plata la ocupación europea no tuvo como fundamento la explotación de minas de metales preciosos o el establecimiento de plantaciones de productos exportables (cuyo funcionamiento insumió mayor mano de obra esclava) aquí el componente de origen africano fue más limitado (Pi Hugarte y Vidart, 1969).

5.4. Mezcla genética

En el departamento de Tacuarembó la población general presentó porcentajes de aportes genéticos de 67,2% europeo, 20,3% indígena y 12,5% africano para el total de la muestras, mientras que en Rivera el porcentaje fue 64,2%, 32,1% y 3,7% respectivamente.

Si comparamos dichos resultados con los obtenidos para la región previamente, a partir de marcadores biparentales, se puede afirmar que se mantuvo el patrón establecido de mayor aporte del componente europeo (debido a que en Río de La Plata la inmigración transoceánica ha tenido un enorme impacto), una importante presencia aborígen, y un

menor aporte subsahariano (ya que la ocupación europea no tuvo como fundamento la explotación de minas o el establecimiento de plantaciones).

En 1994 para una muestra del Hospital de Tacuarembó, usando 22 *loci* en grupos sanguíneos, proteínas de suero sanguíneo y HLA, Mónica Sans determinó que el aporte caucásico variaba entre 54 y 60%, el africano entre 11 y 15% y el amerindio entre 27 y 31%, valores recalculados por Sans y colaboradores (1997) donde reportaron frecuencias de 65%, 15% y 20% respectivamente. En el año 2019, Sara Flores estimó por medio de 70 marcadores individuales de ancestría (AIMs) un 78,6% de ascendencia europea, 13,6% indígena y 7% africana en la población general de Tacuarembó, mientras que en una muestra de hipertensos atendidos en ASSE obtuvo valores de 73,2%, 22,7% y 8% respectivamente. El mismo año Patricia Mut, también utilizando 70 AIMs en Tacuarembó determinó, 70,3% de aporte europeo, 18,8% indígena y 11% africano. Estos y otros valores de la región noreste se pueden observar en la Tabla 19.

Al compararnos dichos resultados con los obtenidos para nuestra población de estudio podríamos afirmar que los datos a nivel general son más similares a los resultados de Sans et al. (1997) y de Mut (2019) para la ancestría autosómica, pese a que en el presente estudio solamente se analizaron variantes de 3 sistemas sanguíneos. Siendo importante destacar que estos cálculos pueden variar de acuerdo a la muestra utilizada, la técnica seleccionada y el algoritmo que emplea cada software. Incluso para nuestros propios datos de Tacuarembó se observaron diferencias en los aportes genéticos al variar solamente el número de individuos de cada muestra.

Noreste	Marcador	Aporte			Bibliografía
		Europeo	Indígena	Africano	
Tacuarembó	22 <i>loci</i>	54-60	27-31	11-15	Sans, 1991
Tacuarembó	22 <i>loci</i>	65,0	20,0	15,0	Sans et al., 1997
Tacuarembó (pob. general)	70 AIMs	78,6	13,6	7,0	Flores, 2019
Tacuarembó (Hipertensos)	70 AIMs	73,2	22,7	8,0	Flores, 2019
Tacuarembó	70 AIMs	70,3	18,8	11,0	Mut, 2019
Tacuarembó	8 ALUs	63,0	7,0	30,0	Vega et al., 2020
Tacuarembó	3 sistemas	67,2	20,3	12,5	Este estudio
Rivera	3 sistemas	64,2	32,1	3,7	Este estudio
Cerro Largo	19 <i>loci</i>	82,0	8,0	10,0	Sans et al., 2006

Tabla 19. Estimación de los aportes poblacionales del Noreste, empleando distintos sistemas genéticos biparentales.

Los resultados obtenidos en este trabajo para ambos departamentos llamaron nuestra atención ya que se esperaba encontrar un mayor aporte africano y un menor componente indígena en Rivera de acuerdo a procesos históricos locales, que indican una mayor influencia luso-brasileña, que utilizaba mano de obra esclava (Olyntho et al., 1970). Así como también a datos del censo del Instituto Nacional de Estadística (INE, 2011), que incluyó dos preguntas respecto a la ancestría, una sobre autoadscripción y otra sobre ancestros. Los datos censales indican que Rivera es el segundo departamento (el primero es Artigas) con mayor porcentaje de ascendencia africana autodeclarada como principal, lo cual representa el 12% de sus residentes, pero el quinto en cuanto a ascendencia indígena (3,1%); mientras que en Tacuarembó la situación es prácticamente inversa: ocupa el quinto puesto en ascendencia africana (6,4%) y el primer lugar en ascendencia indígena con 5,7% (INE, 2011, Cuadro Nº 4, población por sexo y principal ascendencia étnica racial, según departamento; Observatorio Territorio Uruguay, 2019). El anacronismo entre los datos genéticos obtenidos y censales no puede ser atribuido a los primeros, ya que estos son objetivos y coinciden con distintos estudios. Sino que deben explicarse por otros factores, como desconocimiento de la historia familiar, ocultamiento, falta de familiarización con el tema tratado o incluso el mismo muestreo: por ejemplo para el caso de Rivera, se corresponde solamente a la capital departamental, lo cual no es necesariamente válido para el resto del departamento. En relación a la falta de reconocimiento de la ancestría indígena a nivel personal los motivos son complejos y, fundamentalmente, se centran en la identidad nacional que ignora el aporte indígena a partir del presunto exterminio ocurrido en la década de 1830 (Sans, 2017, Sans et al., 2021).

5.4.1. Aporte genético, lugar de atención y nivel socioeconómico

Como se mencionó anteriormente, para evitar un sesgo socioeconómico se buscó un equilibrio en el muestreo entre prestadores de salud pública y privada. Basado en que diferentes investigaciones en distintos países de Latinoamérica mostraron diferencias en el origen de la población, que pueden catalogarse genéricamente como producto de desigualdades socioeconómicas (Avena et al., 2006; Martínez et al., 2007; Schwab et al., 2019). En el caso de Uruguay en una investigación realizada en el departamento de Montevideo en el periodo 2007-2009, se observó una diferencia significativa según prestador de salud y en base a esos resultados se concluyó que la población de Montevideo era heterogénea y subestructurada por motivos socioeconómicos, lo cual repercute en los

orígenes de los distintos aportes genéticos recibidos (Sans et al., 2021). Por esta razón se consideró apropiado observar que ocurría con la muestra del noreste y tomar en cuenta la creación del Fondo Nacional de Salud (FONASA) en 2008. Este abarca a todos los trabajadores o dependientes de trabajadores dentro del sistema formal, los cuales tienen derecho a elegir su prestador de salud entre Administración de los Servicios de Salud del Estado (ASSE) o Instituciones de Asistencia Médica Colectiva (IAMC) que son el principal componente del subsector privado (mutualistas).

En el departamento de Tacuarembó para la población afiliada a ASSE el componente africano fue el que menos varió respecto a la población general con 8,1%, el europeo disminuyó a 55,6% y por consiguiente el indígena aumentó a 36,3%. Esto contrastó con los datos de la mutualista (Comta) donde prevaleció ampliamente la ascendencia europea con 72,2%, aumentó la africana a 13,5% y la indígena alcanzó valores mínimos con 14,3%. En Rivera se dio la situación opuesta, los mayores valores de ascendencia europea (72,9%) se dieron en la muestra de ASSE y disminuyó la ascendencia indígena y africana (24,2% y 2,9%), mientras que en mutualista el componente europeo alcanzó las mínimas de la región con 53,9% y el indígena valores máximos de 39,8%. Estos resultados no mostraron una tendencia clara para poder afirmar la existencia de un sesgo socioeconómico y no se tiene claro porque Rivera no siguió la tendencia encontrada en otros análisis. Lo que si podemos afirmar es que en base a datos de Encuesta Continua de Hogares (ECH) del INE, en el interior del país el porcentaje de personas afiliadas a ASSE es mayor (Tacuarembó= 53,9%, y Rivera= 48,1%) que en la capital, donde se dan los valores mínimos con 20% (Carnevale et al., 2011). A la vez que después de la creación del FONASA el principal cambio observado lo constituye el sensible aumento de la cobertura a través del sistema mutual, siendo este mayor en los cuartiles medios de ingreso (Oreggioni, 2012).

Los datos de mezcla genética concuerdan con el análisis de PCoA (Figura 23) en el que las muestras de Tacuarembó ASSE y Rivera mutualista mapean casi superpuestas, indicando mayor similitud entre ellas y donde las 4 muestras del noreste se ubican en el mismo cuadrante que la población parental europea, la cual representa el componente principal de la ascendencia de la región. Las poblaciones indígena y africana se ubican en otros cuadrantes, pero la africana a mayor distancia, lo que es concordante con el menor aporte genético.

6. Conclusión

Los resultados obtenidos representan la primera investigación en el país con un relevamiento a nivel molecular para determinar las variantes genotípicas y génicas de los sistemas sanguíneos ABO, Duffy y Diego e incluyen los primeros datos de genética de poblaciones y estudios de ancestría para el departamento de Rivera.

En este estudio se reporta la distribución de las frecuencias fenotípicas, genotípicas y alélicas en de Tacuarembó y Rivera, indicando que ambas poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas diferencias para ninguno de los sistemas analizados en forma particular ni en su conjunto. Sin embargo el hecho de analizarlas por separado permitió determinar leves diferencias entre las poblaciones de ambos departamentos, lo que seguramente responda a procesos individuales históricos y recientes de esta región.

La presencia de los alelos DI^*A y FY^{*ES} , característicos de poblaciones indígenas y subsaharianas, respectivamente, y que presentan frecuencia nula entre los europeos, fueron determinantes para poder evidenciar diferencias genéticas entre las muestras. Al analizar las frecuencias de forma individual para cada sistema se observó en Rivera un mayor componente indígena y un menor componente africano en relación a estos alelos. Lo cual se reflejó en el análisis de mezcla génica, pero fue contrario a las frecuencias del sistema ABO que indicaron un mayor componente indígena en Tacuarembó.

En cuanto a distancias genéticas, se demostró que a nivel general, la muestra del noreste del país tiende a agrupar por su similitud genética con las europeas. En los dendrogramas y F_{st} se puede observar que para el sistema Duffy la diferenciación genética de acuerdo a continentes fue más exacta que en los sistemas ABO y Diego. En ABO se observó una tendencia de las muestras uruguayas a agruparse con las poblaciones españolas, pero manteniendo diferencias pequeñas con otras poblaciones mundiales a excepción de la indígena, la cual por carecer de los alelos A y B y por tener un predominio de la variante O^{1v} , tuvo diferencias significativas con el resto. El sistema Diego, por su parte, para el caso de Rivera se caracterizó por una mayor similitud con las poblaciones asiáticas y para el departamento de Tacuarembó, con las brasileras y argentinas. Europa y África no mostraron diferencias debido a la fijación del alelo DI^*B y aquellas que tenían un alto componente indígena se diferenciaron del resto.

Respecto a los análisis de mezcla genética, en ambos departamentos el componente europeo fue el que predominó, seguido por el indígena y en menor medida el africano coincidiendo estos resultados con estudios previos. Pero Rivera mostró un mayor porcentaje de ascendencia indígena y un menor porcentaje africano que Tacuarembó, siendo este dato contrario de lo que se esperaría encontrar de acuerdo procesos históricos locales y a las encuestas de auto-adscrición y ancestría de la población.

En cuanto a las diferencias según prestador de salud los resultados no mostraron una tendencia clara para poder afirmar la existencia de un sesgo socioeconómico. En el departamento de Rivera los componentes africano e indígena fueron más altos en mutualistas, contrario a lo que ocurrió en Tacuarembó donde el componente indígena en ASSE fue más del doble al encontrado en la mutualista. Por esta razón se sugiere ser muy cuidadoso a la hora de obtener muestras de poblaciones representativas de una ciudad o región y no realizar muestras por conveniencia que puedan incurrir en sesgos.

El hecho de contar con investigaciones previas para el departamento de Tacuarembó permitió comparar resultados y con ello corroborar que el análisis de los sistemas sanguíneos ABO, Diego y Duffy en su conjunto constituyen una herramienta útil para el análisis de mezcla genética, reflejando precisión para determinar la contribución parental al *pool* genético de poblaciones trihíbridas como la de Uruguay y de América Latina en general.

Se demuestra una vez más que a pesar de su pequeño territorio y baja densidad poblacional, Uruguay presenta diferencias respecto a su estructura genética incluso en departamentos limítrofes y con tanta influencia entre sí como Tacuarembó y Rivera.

A futuro se pretende continuar la línea de esta investigación incorporando más sistemas sanguíneos, ya que con tres sistemas y 10 alelos estuvimos al límite de poder determinar mezcla genética. También se espera profundizar en aspectos del sesgo socioeconómico y contar con los datos del próximo Censo de Población de Uruguay en 2023 para fortalecer nuestro trabajo.

7. Referencias Bibliográficas

- Acosta, E. (2015). Análisis de las frecuencias genotípicas del sistema ABO mediante el uso de técnicas moleculares. [Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/6370>.
- Acosta, O., Solano, L., Escobar, J., Fernandez, M., Solano, C., Fujita, R. (2014). Frequencies of Blood Group Systems MNS, Diego, and Duffy and Clinical Phases of Carrion's Disease in Amazonas, Peru. *Interdiscip Perspect Infect* 2014:576107. DOI: [10.1155/2014/576107](https://doi.org/10.1155/2014/576107)
- Alvarado Guzmán, VM., Dubón Medina, MJ. (2012). Tipificación de antígenos eritrocitarios del sistema Rh y Kell en donadores de sangre que asistieron a dos hospitales de la ciudad de Guatemala en el año 2009 y 2010. [Tesis de grado, Universidad de San Carlos de Guatemala]. https://nanopdf.com/download/universidad-de-san-carlos-de-guatemala-facultad-5af11331631b5_pdf
- Arbeláez-García, C.A. (2009) Sistema del grupo Sanguíneo ABO. *Medicina y Laboratorio*, 15:329-346. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl097-8c.pdf>
- Ansart-Pirenne, H., Martin-Blanc, S., Le Penneç, P.-Y., Rouger, P., Cartron, J.-P., y Tournamille, C. (2007). FY*X real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis associated with a complete one-step real-time FY genotyping. *Vox Sanguinis*, 92(2), 142–147. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00872.x>
- Arreygue-Avila, M. (2011). Determinación de los alelos principales de los grupos sanguíneos Duffy y Diego, 2011. [Tesis de maestría, Instituto Nacional de Perinatología]. <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8443/1/DETERMINACION%20DE%20LOS%20ALELOS%20PRINCIPALES%20DE%20LOS%20GRUPOS%20SANGUI.pdf>
- Avello, B. y González G. (2013). Sistema sanguíneo Duffy. [Diapositiva de PowerPoint]. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Escuela de Tecnología Médica

Inmunohematología y Banco de sangre Integrantes.

<https://es.slideshare.net/barbaraavega/sistema-duffy1>

Avena, S., Goicochea, A., Dugoujon, J. M., Rey, J., Dejean, C., y Carnese, F. R. (2006). Mezcla genética en la región metropolitana de Buenos Aires. *Medicina (Argentina)*, 66:113-118. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-440398>

Avena, S., Parolin, M., Boquet, M., Dejean, C., Postillone, M., Alvarez, T., Di Fabio Rocca, F., Mansilla, F., Jones, L., Dugoujon, J., Carnese, F. (2010). Mezcla génica y linajes uniparentales en Esquel (Pcia. de Chubut). Su comparación con otras muestras poblacionales argentinas. *Journal of Basic y Applied Genetics*, 21 (1): 01-14. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-62332010000100001&lng=es&tlng=es.

Baltodano Ugarte, K.J., Jarquín Ramos, R.E., Carrillo, M.F (2014). Frecuencia de fenotipos de grupos sanguíneos ABO y RHESU (D) en estudiantes de la carrera de microbiología del Instituto Politécnico de la salud Luis Felipe Moncada UNAN-Managua, (Monografía de Licenciatura). Universidad nacional autónoma de Nicaragua, Managua. <https://1library.co/document/y937glij-frecuencia-fenotipos-sanguineos-estudiantes-microbiologia-instituto-politecnico-octubre.html>

Baleotti W, Rios M, Reid ME, Fabron A, Pellegrino J, Saad STO, Castilho L 2003. A novel DI*A allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian Indians. *Vox Sanguinis*, 84: 326–330, DOI:[10.1046/j.1423-0410.2003.00297.x](https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2003.00297.x)

Bégat, C., Bailly, P., Chiaroni, J., Mazières, S. (2015). Revisiting the Diego Blood Group System in Amerindians: Evidence for Gene-Culture Comigration. *PLoS One*. 10(7):e0132211. DOI: [10.1371/journal.pone.0132211](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132211)

Bruce, L.J., Anstee, D.J., Spring, F.A., Tanner, M.J. (1994). Band 3 Memphis variant II. Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Dia) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation Pro854-->Leu. *J Biol Chem*. 269(23):16155-16158. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33986-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33986-8)

- Buzzi, A.E. (2015). Karl Landsteiner y los grupos sanguíneos. ALMA- Cultura y Medicina. https://www.academia.edu/40235387/Karl_Landsteiner_y_los_grupos_sangu%C3%ADneos
- Carnevale, M., Cuello, L., Horjales, R., Macari, A., Menéndez, J., Perelmuter, B., Toledo, C. (2011). Principales Resultados Encuesta Continua de Hogares 2011. Instituto Nacional De estadística. Uruguay.
- Castillo-Macías, A., Díaz-Chuc, E.A, Sotelo-Coronado, J.I., Llaca-Díaz, J.M., Avilés-Rodríguez, L.E., Pérez-Chávez, F., Cázares-Tamez, R., Mercado-Del Ángel, F. (2018). Anti-Fya antibodies with anamnestic reaction associated to anti-D in intrauterine transfusion: A case report. *Ginecol Obstet Mex.*; 86(02):158-163. <https://doi.org/10.24245/gom.v86i2.1550>
- Cavalli-Sforza, L. L., Menozzi, P., Piazza, A. (1995). The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA. DOI: [10.2307/2058750](https://doi.org/10.2307/2058750)
- Cavasini, C.E., de Mattos, L.C., Couto, Á.A., Couto, V.S., Gollino, Y., Moretti, L.J., Bonini-Domingos, C.R., Rossit, A.R., Castilho, L., Machado, R.L. (2007). Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J.* 6:167. DOI: [10.1186/1475-2875-6-167](https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-167)
- Chaudhuri, A., Polyakova, J., Zbrzezna, V., Williams, K., Gulati, S., Pogo, A.O. (1993). Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(22):10793-7. DOI: [10.1073/pnas.90.22.10793](https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10793)
- Costa, D.C., Schinaider, A.A., Santos, T.M., Schörner, E.J., Simon, D., Maluf, S.W., de Moraes, A.C., Silva, M.C. (2016). Frequencies of polymorphisms of the Rh, Kell, Kidd, Duffy and Diego systems of Santa Catarina, Southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 38(3):199-205. DOI: [10.1016/j.bjhh.2016.04.005](https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.04.005)
- Cotorruelo, C., Biondi, C., Racca, L., Borrás, S.G., Racca, A. (2009). Duffy genotyping facilitates transfusion therapy. *Clin Exp Med.* 9(3):249-51. DOI: [10.1007/s10238-009-](https://doi.org/10.1007/s10238-009-)

[0032-6](#)

Cutbush, M. y Mollison P.L. (1950). The Duffy blood group system. *Heredity* (Edinb); 4(3):383-9. DOI: [10.1038/hdy.1950.31](#)

Daniels, G. (2002) *Human Blood Groups*, 2nd edition. Blackwell Science. https://www.academia.edu/40827637/Human_Blood_Groups_2nd_ed_by_Geoff_Daniels

Daniels, G., Fletcher, A., Garratty, G., Henry, S., Jorgensen, J., Judd, W.J., Levene, C., Lomas-Francis, C., Moulds, J.J., Moulds, J.M., Moulds, M., Overbeeke, M., Reid, M.E., Rouger, P., Scott, M., Sistonen, P., Smart, E., Tani, Y., Wendel, S., Zelinski, T. (2004). ISBT. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang.* 87(4):304-16. DOI: [10.1111/j.1423-0410.2004.00564.x](#)

Daniels G. (2005). The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol.* Aug; 14(3-4):143-53. DOI: [10.1016/j.trim.2005.03.003.](#)

Daniels, G. y Bromilow, I. (2007). *Essential Guide to Blood Groups*, 2nd edition. Blackwell Publishing. <https://compress-pdf.bcad.info/>

Delaney, M., Harris, S., Haile, A., Johnsen, J., Teramura, G., Nelson, K. (2015). Red blood cell antigen genotype analysis for 9087 Asian, Asian American, and Native American blood donors. *Transfusion.* 55(10):2369-75. DOI: [10.1111/trf.13163](#)

Demarchi, D.A. (2009). Microsatelites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica.* 11(1):73-88. <https://revistas.unlp.edu.ar/raab/issue/view/42>

De Silva, J.R., Amir A., Lau Y.L., Ooi, C.H., Fong, M.Y. (2019). Distribution of the Duffy genotypes in Malaysian Borneo and its relation to *Plasmodium knowlesi* malaria susceptibility. *PLoS One.* 14(9):e0222681. DOI: [10.1371/journal.pone.0222681](#)

- Eder, A.F. (2006). Update on HDFN: new information on long-standing controversies. *Immunohematologi*. 22(4):188-95. DOI: [10.21307/immunohematology-2019-379](https://doi.org/10.21307/immunohematology-2019-379)
- Estrada-Carsolio, C. (2003). *Gaceta Médica de México*. Volumen 139, Suplemento 3. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2003/gms033e.pdf>
- Excoffier, L. y Lischer, H. (2015). *An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis*. Swiss Institute of Bioinformatics. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>
- Ferri G., Bini C., Ceccardi S., Ingravallo F., Lugaresi F., Pelotti S. (2006). Minisequencing based genotyping of Duffy and ABO blood groups for forensic purposes. *Journal of Forensic Sciences*. 51(2):357-360. [Doi:10.1111/j.1556-4029.2006.00058.x](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00058.x).
- Figuroa D. (2013). The Diego blood group system: a review. *Immunohematology*. 29(2):73-81. PMID: 24094240. <https://sciendo.com/pdf/10.21307/immunohematology-2019-128>
- Flores Gutiérrez, S. (2019). *Genes relacionados con la metabolización de medicamentos en pacientes hipertensos y población general, y su relación con el mestizaje poblacional en Tacuarembó*. [Tesis Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de la República. PEDECIBA Biología, Subárea Genética]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/22245>
- Fresquet Febrer, JL. (2010). *Karl Landsteiner (1868- 1943). Epónimos y biografías médicas*. <https://www.historiadelamedicina.org/pdfs/landsteiner.pdf>
- Goicoechea, A. S. (1992). *Análisis y distribución de los Polimorfismos de los grupos sanguíneos, Isoaglutininas Abo y Estado Secreto (ABH) en una población mapuche de Blancura Centro, provincia de Río Negro*. [Tesis de doctorado de la Universidad de Buenos Aires en Antropología]. <http://repositorio.filo.uba.ar/handle/filodigital/1640>
- Góngora-Biachi, R.A. (2005). La sangre en la historia de la humanidad. *Rev Biomed*;16 (4):281-288. <http://dx.doi.org/10.32776/revbiomed.v16i4.429>

- Góngora, F.B. (2015). Frecuencia del antígeno y aloanticuerpos del sistema “Diego” en donantes de sangre del hemocentro de la Cruz Roja, 2015. [Tesis de grado, Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/9650>
- Góngora, F.B. Chiriboga-Ponce, R.F. (2018). Frecuencia del antígeno y aloanticuerpos del sistema Diego en donantes de sangre. *Gaceta Médica de México*. vol 154, p 16-21. <https://www.mediagraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2018/gm181c.pdf>
- Grispan, S. (1983). Grupos sanguíneos ABO Y Rh , *Rev. Medica Hondur*. VOL. 51. <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/1983/pdf/Vol51-3-1983-6.pdf>
- Gunalan, K., Niangaly, A., Thera, M.A., Doumbo, O.K., Miller, L.H. (2018). Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation? *Trends Parasitol*; 34(5):420-429. DOI: [10.1016/j.pt.2018.02.006](https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.006)
- Hammer, Ø. (2018). PAST PAleontological STatistics Version 3.2. Reference manual. Natural History Museum University of Oslo. https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4407502/mod_resource/content/1/past3manual.pdf
- Henríquez, H., Moraga M, Llop, E., Rothhammer, F. (2004). Caracterización genético molecular de habitantes de Caleta Paposo, último reducto Chango en Chile. *Revista médica de Chile*, 132(6), 663-672. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000600002>
- Herrera-Paz, E.F. (2015). Aislamientos genéticos y costumbres endogámicas en tres municipios rurales de Honduras. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 54(4):504-13. <https://www.redalyc.org/journal/4577/457755024014/html/>
- Höher, G., Fiegenbaum, M., Almeida, S. (2018). Molecular basis of the Duffy blood group system. *Blood Transfus*. 16(1):93-100. DOI: [10.2450/2017.0119-16](https://doi.org/10.2450/2017.0119-16)

- Howes, R.E., Patil, A.P., Piel, F.B., Nyangiri, O.A., Kabaria, C.W., Gething, P.W., Zimmerman, P.A., Barnadas, C., Beall, C.M., Gebremedhin, A., Ménard, D., Williams, T.N., Weatherall, D.J., Hay, S.I. (2011). The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun.* 2:266. DOI: [10.1038/ncomms1265](https://doi.org/10.1038/ncomms1265)
- Hummel, S., Schmidt, D., Kahle, M., Herrmann, B. (2002). ABO blood group genotyping of ancient DNA by PCR-RFLP. *Int J Legal Med* 116(6), 327–333. <https://doi.org/10.1007/s00414-002-0315-x>
- Hummel, S. (2003). *Ancient DNA Typing, Methods, Strategies and Applications*. Ed. Springer. DOI: [10.1007/978-3-662-05050-7](https://doi.org/10.1007/978-3-662-05050-7)
- INE (Instituto Nacional de Estadísticas), Censo 2011. Cuadro 4, población por sexo y principal ascendencia étnica racial, según departamento. http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:GBoM8xjO4rIJ:www.inecuba.gov.cu/document_library/get_file%3Fuuid%3D80122e2a-ce2e-490b-921a-618f74fd8141%26groupid%3D10181&cd=2&hl=es-419&ct=clnk&gl=uy&client=firefox-b-d
- Ikin, E., Mourant, A., Pettenkofer, H., Blumenthal, G. (1951). Discovery of the expected haemagglutinin, anti-Fyb. *Nature.* 168(4288):1077-8. <https://doi.org/10.1038/1681077b0>
- InfoStat (2008). *InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina (PDF) *Infostat: manual del usuario*. https://www.researchgate.net/publication/283491340_Infostat_manual_del_usuario
- ISBT (International Society of Blood Transfusion). Red Cell Immunogenetics and Blood Group. *Terminology*. <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>
- Layrisse, M., y Arends, T. (1958). Estado actual de las investigaciones sobre el Factor Diego. *Antropológica.* (4), 17-26.

- Lang, K., Wagner, I., Schöne, B., Schöfl, G., Birkner, K., Hofmann, J.A., Sauter, J., Pingel, J., Böhme, I., Schmidt, A.H., Lange, V (2016). ABO allele-level frequency estimation based on population-scale genotyping by next generation sequencing. *BMC Genomics*. 20;17:374. DOI [10.1186/s12864-016-2687-1](https://doi.org/10.1186/s12864-016-2687-1)
- Levine, P., Layrisse, M., Robinson, E. A., Arends, T., Domingues Sisco, R. (1956). The Diego blood factor. *Nature*. 177(4497):40-1. DOI: [10.1038/177040b0](https://doi.org/10.1038/177040b0)
- Llop, E., Henríquez, H., Moraga, M., Castro, M., Rothhammer, F. (2006). Caracterización molecular de alelos ABO*O del locus de grupo sanguíneo ABO en tres poblaciones chilenas. *Rev Méd Chile*; 134: 833-840. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872006000700005>
- López, A. (1992). *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología* (3ª ed., Vol IV). España: Ediciones Universidad de Salamanca, 3- 39, 279-301.
- Lux, S.E., John, K.M., Kopito, R.R., Lodish, H.F. (1989). Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). *Proc Natl Acad Sci USA*. 86(23):9089–93. DOI: [10.1073/pnas.86.23.9089](https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9089)
- Malomgré W, Neumeister B. (2008). Recent and future trends in blood group typing. *Anal Bioanal Chem*. 2009 Mar; 393(5):1443-51. DOI: [10.1007/s00216-008-2411-3](https://doi.org/10.1007/s00216-008-2411-3)
- Martínez, H., Rodríguez-Larralde, A., Izaguirre, M. H., y Castro de Guerra, D. (2007). Admixture estimates for Caracas, Venezuela, based on autosomal, Y-chromosome, and mtDNA markers. *Human Biology*, 79, 201-213. DOI: [10.1353/hub.2007.0032](https://doi.org/10.1353/hub.2007.0032)
- Mattos, L.C., Cintra, J.R., Sanches, F.E., Cintra, J. R., Salles, A.B., Bonini-Domingos, C.R., Moreira H.W. (2001). Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Hematologia y Hemoterapia*; 23(1):15-22. DOI: [10.1590/S1516-84842001000100003](https://doi.org/10.1590/S1516-84842001000100003)
- Mazana, J.S. (2001). *El Rincón de la Ciencia*. Karl Landsteiner y los grupos sanguíneos.

[Archivo PDF]. <http://centros5.pntic.mec.es/ies.victoria.kent/Rincon-C/C>

Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F., McGinniss, M.H. (1976) The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med. 295(6):302-4. DOI: [10.1056/NEJM197608052950602](https://doi.org/10.1056/NEJM197608052950602)

Moulds, J.M., Hayes, S., Wells, T.D. (1998). DNA analysis of Duffy genes in American blacks. Vox Sang. 74(4):248-52. PMID: 9691406.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9691406/>

Mourant, A.E, Kopec A.C, Domaniewska-Sobczak K. The distribution of the human blood groups. 2nd ed. London: Oxford University Press, 1976.

Nathalang, O., Intharanut, K., Siriphanthong, K., Nathalang, S., Kupatawintu, P. (2015). Duffy blood group genotyping in Thai blood donors. Ann Lab Med. 35(6):618-23. DOI: [10.3343/alm.2015.35.6.618](https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.6.618)

Nathalang, O., Panichrum, P., Intharanut, K., Thattanon, P., Nathalang, S. (2016). Distribution of DI*A and DI*B Allele Frequencies and Comparisons among Central Thai and Other Populations. PLoS One. 1(10):e0165134. DOI: [10.1371/journal.pone.0165134](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165134)

Niangaly, A., Gunalan, k., Amed-Ouattara, Coulibaly, D, Sá, J.M., Adams, M., Travassos, M.A., Ferrero, J., Laurens, M.B., Kone, A.K., Thera, M.A., Plowe, C.V., Miller, L.H., Doumbo, O.K. (2017). *Plasmodium vivax* Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. Am J Trop Med Hyg. 97(3):744-752. DOI: [10.4269/ajtmh.17-0254](https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0254)

Nishimukai, H., Fukumori, Y., Tsujimura, R., Okiura, T., Tanabe, R., Orimoto, C., Ueda, N. (2009). Rare alleles of the ABO blood group system in two European populations. Legal Medicine.11 (1): 479-481. DOI: [10.1016/j.legalmed.2009.01.058](https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.01.058)

Novaretti, M.C., Ruiz, A.S., Dorlhiac-Llacer, P.E., Chamone, D.A. (2010). Application of real-

time PCR and melting curve analysis in rapid Diego blood group genotyping. *Immunohematology*. 26(2):66-70. DOI: <https://doi.org/10.21307/immunohematology-2019-205>

Observatorio Territorio Uruguay (2019). Tacuarembó. Consultada noviembre 2022
<https://otu.opp.gub.uy/perfiles/pdf?title=Tacuaremb%C3%B3#:~:text=El%20departamento%20de%20Tacuaremb%C3%B3%20cuenta,de%20la%20poblaci%C3%B3n%20es%20urbana.>

Observatorio Territorio Uruguay (2019). Rivera. Consultada noviembre 2022
<https://otu.opp.gub.uy/perfiles/pdf?title=Rivera#:~:text=El%20departamento%20de%20Rivera%20cuenta,de%20la%20poblaci%C3%B3n%20es%20urbana.>

Observatorio Territorio Uruguay. Indicador: Población afrodescendiente (%) – Censo. Consultada noviembre 2022.
https://otu.opp.gub.uy/?q=listados/listados_datos_formato&id=2887&deptos=1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19®iones=&municipios=&loc=&fecha=2011-01-01

Olsson, M.L., Hansson, C., Avent, N.D., Akesson, I.E., Green, C.A., Daniels, G.L. (1998). A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*. 38(2):168-73. DOI: [10.1046/j.1537-2995.1998.38298193099.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1998.38298193099.x)

Olyntho, L., Pereyra, A., Tito, M., Cairello, J. (1970). Los Departamentos n. 3– Rivera.
<https://anaforas.fic.edu.uy/jspui/handle/123456789/9151>

Oreggioni, I. (2012). II. El camino hacia la cobertura universal en Uruguay: cobertura poblacional del Sistema Nacional Integrado de Salud. Disponible en:
https://www.paho.org/uru/dmdocuments/Capitulo_2.pdf

Owen, R. (2000). Karl Landsteiner and the first human marker locus. *Genetics*, 155(3), 995–998. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.3.995>

Parolin, M.L., Avena, S.A., Fleischer, S., Pretell, M., Di Fabio Rocca, F., Rodríguez, D.A., Dejean, C.B., Postillone, M.B., Vaccaro, M.S., Dahinten, S. L., Manera, G., Carnese, F.R. (2013). Análisis de la diversidad biológica y mestizaje en la ciudad de Puerto Madryn (Prov. de Chubut, Argentina)/ Analysis of biological diversity and miscegenation in the city of Puerto Madryn (Province of Chubut, Argentina). *Revista Argentina De Antropología Biológica*, 15(1), 61–75.

<https://revistas.unlp.edu.ar/raab/article/view/693>

Peakall, R. y Smouse, P.E. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*. ;28(19):2537-9. DOI: [10.1093/bioinformatics/bts460](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460)

Pi Hugarte, R., Vidart, D., (1969). El legado de los inmigrantes-I. *Nuestra Tierra* 29. Montevideo.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ y Sham PC (2007). PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 81. <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>

Ramos, D., Castro, A., da Silva, J., Gonzales-Mieres, L., Veiga, J. (1970). Los departamentos n. 15 – Tacuarembó.

<https://anaforas.fic.edu.uy/jspui/handle/123456789/9172>

Reid, M.E. (2009). Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 171-7. DOI: [10.1182/asheducation-2009.1.171](https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.171)

Rodríguez-Larralde, A., Dipierri, J.E., Alfaro, E.L., Sans, M. (2021). Agrupamientos poblacionales en Uruguay inferidos en base a la distribución de apellidos. . *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 23(1), 1-2.

<https://dx.doi.org/10.24215/18536387e025>

Salzano, F.M. and S. Callegari-Jacques. (1988). *South American Indians: a case study in evolution*. Oxford: Clarendon Press.

- Sandoval, C. (2014). Frecuencia de antígenos eritrocitarios del sistema ABO y RH (d), en la etnia Weenhayek o Matacos, asentada en el Chaco boliviano, Sucre 2010. *Revista de Energía Química y Física*. Vol.1 No.1 60-95.
- Sanger R., Race R.R., Jack J. (1955). The Duffy blood groups of New York Negroes: the phenotype Fy (a-b-). *Br J Haematol*; 1:370-4. DOI: [10.1111/j.1365-2141.1955.tb05523.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1955.tb05523.x)
- Sans, M. (1991). Características genéticas de la población uruguaya en base al sistema HLAy otros marcadores sanguíneos, y su relación con poblaciones parentales y latinoamericanas. [Tesis para la obtención del grado de Magister en Ciencias Biológicas. PEDECIBA/Facultad de Ciencias].
- Sans, M. (1994). Estudio genético e histórico de la población del departamento de Tacuarembó, Uruguay. [PhD tesis, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay].
- Sans, M., Salzano, F.M., y Chakraborty, R. (1997). Historical genetics in Uruguay: Estimates of Biological origins and their problem. *Human Biology*, 69(2):161-170. <http://www.jstor.org/stable/41435808>
- Sans, M., Merriwether, D.A., Hidalgo, P.C., Bentancor, N., Weimer, T.A., Franco, M.H., Alvarez, I., Kemp, B.M. y Salzano, F.M. (2006). Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms. *American Journal of Human Biology*, 18, 513-24. DOI: [10.1002/ajhb.20520](https://doi.org/10.1002/ajhb.20520)
- Sans, M. (2009). “Raza”, adscripción étnica y genética en Uruguay” *Runa* XXX, (2), pp 163-174, FFYL - UBA - ISSN: 0325-1217. <https://www.redalyc.org/pdf/1808/180813903005.pdf>
- Sans, M. (2014). La población del Uruguay y el proceso de mestizaje. *Evolibro- La Enseñanza de la Evolución*. www.evolibro.webnode.es

- Sans, M., Mones, P., Figueiro, G., Barreto, I., Motti, J., Coble, M., Bravi, C., y Hidalgo, P.C. (2014). The mitochondrial DNA history of a former native american village in northern Uruguay. *American Journal of Human Biology*. DOI: [10.1002/ajhb.22667](https://doi.org/10.1002/ajhb.22667)
- Sans, M. (2017). Identidad perdida: discordancias entre la “identidad genética” y la autoadscripción indígena en el Uruguay. *Conversaciones del Cono Sur. Reemergencia indígena en los países del Plata: Los casos de Uruguay y de Argentina*, 3, 1-6. Recuperado de: <https://conosurconversaciones.wordpress.com/volumen-3-numero-1/>
- Sans, M., Figueiro, G., Bonilla, C., Bertoni, B., Cappetta, M., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Mut, P., y Hidalgo, P. C. (2021). Ancestría genética y estratificación social en Montevideo, Uruguay. *Revista Argentina De Antropología Biológica*, 23(1), 029. <https://doi.org/10.24215/18536387e029>
- Schneider, S., Tadei, W.P, Sotero-Martins, A. (2012). Polymorphism of the Duffy blood group system influences the susceptibility to Plasmodium vivax infection in the specific area from Brazilian Amazon. *Rev. Bras. Farm.* 93 (1): 33-37.
- Schwab, M. E., Smeldy, L., Medina, J., Beltramo, J., Sala, C., Sepúlveda, P., Alfaro Gómez, E. L., Dipierri, J. E., Bravi, C. M. y Bailliet, G. (2019). Variabilidad de linajes paternos en dos poblaciones del noroeste argentino: Santiago del Estero y Tucumán. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 21. <https://dx.doi.org/10.24215/18536387e002>
- Seltsam, A., Hallensleben, M., Kollmann, A., Blasczyk, R. (2003). The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood*, 102 (8): 3035–3042. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0955>
- Soyano, A. y Müller de Soyano, A. (2014). El antígeno Diego alcanza los 60 años de edad: su descubrimiento y desarrollo. *Gac Méd Caracas*. 122(1):46-52. http://190.169.30.98/ojs/index.php/rev_gmc/article/viewFile/17633/144814484033.

- Tanner, M.J., Martin, P.G., High, S. (1988). The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. *Biochem J.* 256(3):703-12. DOI: [10.1042/bj2560703](https://doi.org/10.1042/bj2560703)
- Tatarsky, J., Stroup, M., Levine, P., Ernoehazy, W. S. (1959). *Vox Sang.* 4(2):152-4. DOI: [10.1111/j.1423-0410.1959.tb04030.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1959.tb04030.x)
- Tournamille, C., Le Van Kim, C., Gane, P., Cartron, J.P., Colin, Y. (1995). Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. *Hum Genet.* (4):407-10. DOI: [10.1007/BF00208965](https://doi.org/10.1007/BF00208965)
- Trujillo, E. (2012). Sistema Diego. Inmunogenos que nos hermanan. Grupo Iberoamericano de Medicina Transfusional. *Revista argentina de transfusión*, vol: XXXVIII/Nº2, pp. 131-140. <https://www.aahitc.org.ar/rat/RAT022012.pdf>
- Umbria M., Cantons J., Bruguera C., Minias A., de Duró C. B., Catalano G., Santos C., Nogués R., Aluja M. P. (2014). Molecular polymorphism of the ABO blood group: A study in Poland, Spain, and Andorra. *American Journal of Human Biology.* 26 (4): 556 - 558. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22544>
- Vaccaro, M.S. (2017). Determinación molecular del sistema ABO en muestras cosmopolitas de la Argentina. [Tesis Magister en Biología Molecular, Universidad de Buenos Aires]. http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/collect/afamaster/index/assoc/HWA_2208.dir/2208.PDF
- Vega Requena, Y.V., Hidalgo, P.C., Ackermann, E., Flores-Gutierrez, S., Sans, M. (2020). "Genetic Admixture Analysis in the Population of Tacuarembó Uruguay Using Alu Insertions". *Human Biology Open Access Pre-Prints.* 168. https://digitalcommons.wayne.edu/humbiol_preprints/168
- Villanea F., Bolnick D., Monroe C., Worl R., Cambra R, Leventhal A., Kemp BM. Brief communication: Evolution of a specific O allele (O1vG542A) supports unique ancestry of Native Americans. *Am J Phys Anthropol.* 2013 Aug;151(4):649-57. DOI:

[10.1002/ajpa.22292](https://doi.org/10.1002/ajpa.22292)

- Wu, G.G., Su, Y.Q., Yu, Q., Jin, S.Z., Zhao, T.M. (2002) Development of a DNA-based genotyping method for the Diego blood group system. *Transfusion*. 42(12):1553-6. DOI: [10.1046/j.1537-2995.2002.00248.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2002.00248.x)
- Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*. 1990 May 17;345(6272):229-33. DOI: [10.1038/345229a0](https://doi.org/10.1038/345229a0).
- Yazdanbakhsh K. (2001) Molecular Mechanisms Underlying Defective Expression of Blood Group Antigens. *Transfusion Medicine Reviews* 15(1) pp 53-66. <https://doi.org/10.1053/tmrv.2001.19952>
- Yip, S.P., Choi, P.S., Lee, S.Y., Leung, K.H., El-Zawahri, M., Luqmani Y. (2006). ABO blood group in Kuwaitis: detailed allele frequency distribution and identification of novel alleles. *Transfusion*. 46(5):773-779. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00796.x>
- Yip, S.P. (2002). Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet*. 66(Pt 1):1-27. DOI: [10.1017/S0003480001008995](https://doi.org/10.1017/S0003480001008995)
- Yoshida, A. (1982). Biochemical Genetics of Human Blood Group ABO System. *Am JHum Genet* .34:1-14. PMID: 6805317; PMCID: PMC1685199.
- Zafar, M. y Reid, M.E. (1993). "Review: the Diego blood group system" *Immunohematology*, vol.9, no.2, 1993, pp.35-40. <https://doi.org/10.21307/immunohematology-2019-954>
- Zimmerman, P.A., Woolley, I., Masinde, G.L., Miller, S.M., McNamara, D.T., Hazlett, F., Mgone, C.S., Alpers, M.P., Genton, B., Boatman, B.A., Kazura, J.W. (1999) Emergence of FY*A(null) in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(24):13973-7. DOI: [10.1073/pnas.96.24.13973](https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13973)
- Zhou, S., Liu, M., An, W., Liang, X., Yu, W., Piao, F. (2015). A New Method for Analyzing the

Duffy Blood Group Genotype by TaqMan Minor Groove Binding Probes. J Clin Lab Anal. 29(3):203-7. DOI: [10.1002/jcla.21751](https://doi.org/10.1002/jcla.21751)

8. Anexos

Anexo 1

ISBT: Table of blood group systems v10.0 30-JUN-2021

No.	System name	System symbol	Gene name(s)*	LRG	Number of antigens	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	792	4	9q34.2	
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, (GYPE)</i>	793; 794	50	4q31.21	CD235a CD235b
003	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	795	3	22q13.2	CD77
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	796; 797	56	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	<i>BCAM</i>	798	27	19q13.2	CD239
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	799	36	7q33	CD238
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	800	6	19p13.3	
008	Duffy	FY	<i>ACKR1</i>	801	5	1q21-q22	CD234
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	802	3	18q11-q12	
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	803	23	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	804	5	7q22	
012	Xg	XG	<i>XG, CD99</i>	805; 1023	2	Xp22.32	CD99+
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	806	9	1p34.2	
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	807	10	12p13-p12	CD297
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	808	4	7p14	
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	809	3	19p13.2	CD242
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	137;138	9	6p21.3	
018	H	H	<i>FUT1; FUT2</i>	810; 811	1	19q13.33	CD173
019	Kx	XK	<i>XK</i>	812	1	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	813	13	2q14-q21	CD236
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	127	20	1q32	CD55
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	814	12	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	815	6	11p13	CD44
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	816	3	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	817	1	11p15.5	CD151
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	818	8	15q22.3-q23	CD108
027	I	I	<i>GCNT2</i>	819	1	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALNT1</i>	820	2	3q25	
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	821	1	9p13	
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	<i>RHAG</i>	822	4	6p12.3	CD241
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	826	1	9q34.13-q34.3	
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	823	1	4q22.1	CD338
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	824	1	2q36	
034	Vel	VEL	<i>SMIM1</i>	827	1	1p36.32	
035	CD59	CD59	<i>CD59</i>	41	1	11p13	CD59
036	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	1027	4	6p21.1	
037	Kanno	KANNO	<i>PRNP</i>		1	20p13	
038	SID	SID	<i>B4GALNT2</i>		1	17q21.32	
039	CTL2	CTL2	<i>SLC44A2</i>		2	19p13.2	
040	PEL	PEL	<i>ABCC4</i>	1183	1	13q32.1	
041	MAM	MAM	<i>EMP3</i>		1	19q13.33	
042	EMM	EMM	<i>PIGG</i>		1	4p16.3	
043	ABCC1	ABCC1	<i>ABCC1</i>		1	16p13.11	

Anexo 2

Protocolo de extracción de sangre, método “salting-out”

Lavados:

Con el objetivo de aumentar la concentración de ADN se puede recuperar los leucocitos, ya que esta es la única fracción que contiene ADN.

- 1) Descongelar la muestra de sangre y llevarla al agitador.
- 2) Rotular tubos falcon de 15 ml tanto en la tapa como en el cuerpo.
- 3) Pipetear aproximadamente 3 ml de sangra y completar con buffer TIOEIO llevando hasta 14 ml aproximadamente.
- 4) Llevar al agitador o al vortex por lo menos una hora.
- 5) Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos a 20 °C.
- 6) Descartar el sobrenadante cuidadosamente para no perder el pellet.
- 7) Repetir el procedimiento al menos 3 veces más, de modo que el pellet quede lo más limpio posible (preferentemente blanco).

Extracción:

Lisis celular:

Re-suspender el pellet en 4 ml de buffer PK (10mM Tris, 5mM EDTA, 0,5%SDS), y 50 ul de proteinasa K (20 mg/ml).

Dispersar lo más posible el pellet, ya sea mediante vortex o agitación manual.

Incubar 3 hs a 55°C, en caso de que el pellet se disuelva antes no es necesario aguardar a las 3 hs o si pasado ese tiempo no lo hace se puede agregar más proteinasa K. Invertir el tubo cada media hora aproximadamente para ayudar a que el pellet se desintegre con mayor velocidad.

También se puede incubar a 37°C toda la noche.

Desproteización:

Agregar 1,6 ml de NaCl (6M) cada 4,5 ml de pellet incubado con PK, y agitar durante 15 segundos.

Incubar 15 minutos en freezer.

Precipitación del ADN:

Centrifugar 15 minutos a máxima velocidad (4500 RPM).

Recuperar el sobrenadante mediante el uso de pipetas paster (con cuidado de no aspirar residuos del pellet) y pasarlo a un nuevo tubo de 15 ml.

Agregar el doble del volumen de etanol absoluto frio al tubo.

Se comenzaran a formar burbujas en la fase intermedia entre ambas soluciones, luego invertir el tubo suavemente.

Si el procedimiento fue óptimo se formara una pellet el cual se recuperara cuando suba a la superficie del líquido.

Re suspender en agua libre de nucleasas o TE, la cantidad depende del tamaño del pellet recuperado, quedando a criterio del investigador.

Finalmente llevar al baño a 55°C por media hora o hasta que se disuelva el pellet.

Soluciones:

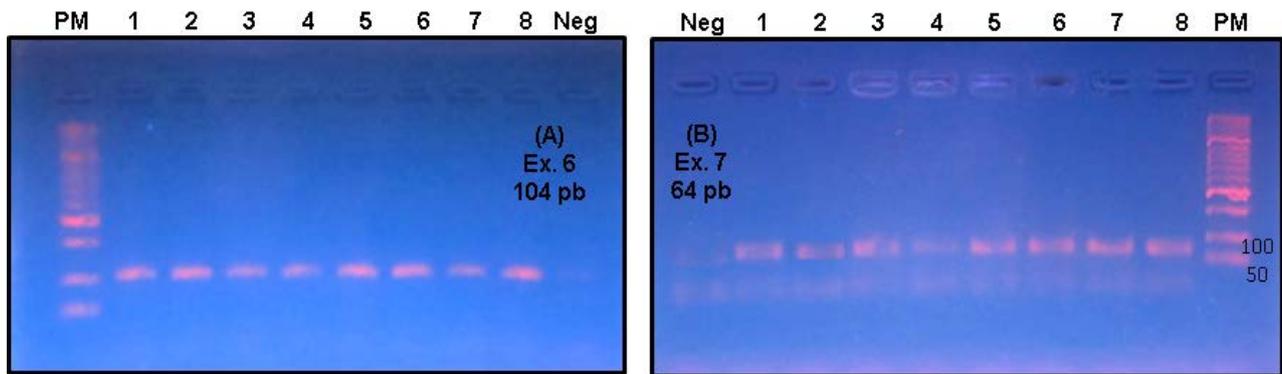
T10E10:	BUFFER PK:	NaCl 6M:
1. TRIS HCl ph 8 1M: 10ml	1. TRIS HCl ph 8 1M: 10ml	1. NaCl: 350,64 gr
2. EDTA 0,5 M: 20 ml	2. EDTA 0,5 M: 10 ml	2. Enrazar a 1 litro de agua
3. Enrazar a 1 litro de agua	3. SDS 10%: 50 ml	-----
-----	4. Enrazar a 1 litro de agua	-----

Anexo 3

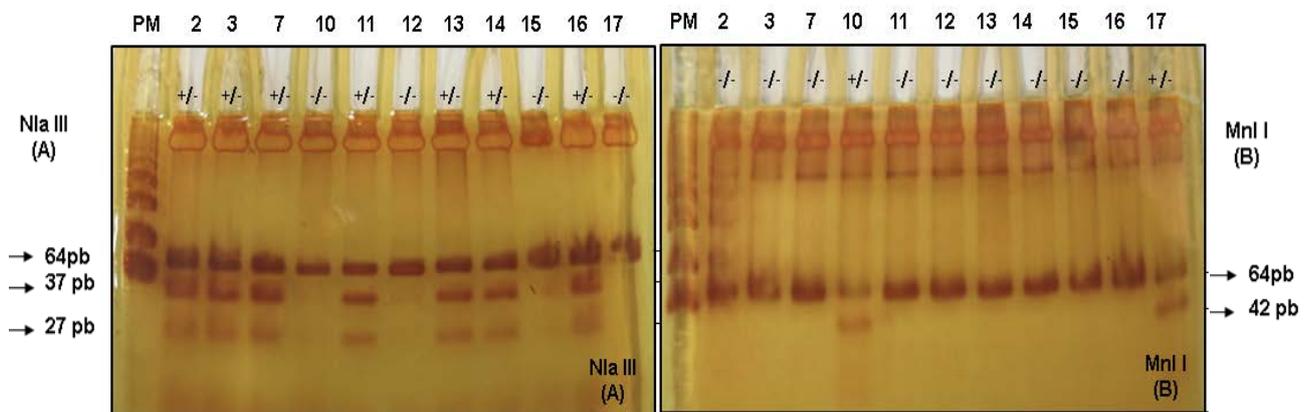
Protocolo de extracción de ADN de saliva (a partir protocolo de sangre de B.Bertoni)

1. Centrifugar 500 ul de saliva a 2500 rpm durante 10 minutos.
2. Descartar sobrenadante.
3. Lavar el pellet con 1 ml de PBS (adicionar el PBS, vortexear, centrifugar por 5 min y descartar el sobrenadante).
4. Agregar 500 ul de solución de lisis celular (Tris HCL pH 8.0 50 mM, EDTA pH 8.0 100 mM, SDS 0.5%) para glóbulos blancos + 15 ul de Proteinasa K y resuspender el pellet (con pipeta).
5. Dejar en baño caliente como mínimo 1 hora u *overnight* a 55° C.
6. Agregar 300 ul de solución de precipitación de proteínas (Acetato de Amonio 7.5 M) y agitar en vortex por 20 segundos.
7. Precipitar proteínas centrifugando a máxima velocidad por 10 minutos. Se observa un pellet en el fondo que son las proteínas.
8. Transferir el sobrenadante a un *ependorf* con 700 ul de isopropanol a -20° C y agitar por inversión. Se observa el ADN precipitado.
9. Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad y descartar el sobrenadante.
10. Lavar el pellet con 500 ul de etanol 70% A 4° C (agregar el etanol, vortexear). Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad y descartar el sobrenadante.
11. Secar el pellet por inversión sobre un papel de filtro por 1 hora (o hasta que esté seco). Se puede acelerar el proceso en baño seco caliente con el tubo destapado para evaporar el etanol (entre 37 y 50° C).
12. Suspender el pellet en 50 ul de agua destilada o buffer TE 1x (Tris pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM). Dejarlo *overnight* a 37°C o una hora a 50 °C.

Anexo 4

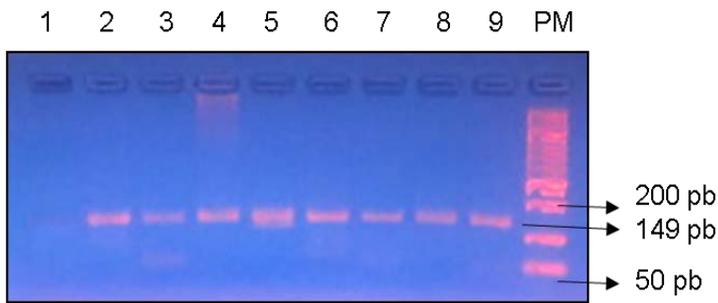


Electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Productos de PCR correspondiente al exón 6 (103/104) pb y del exón 7 a (64 pb).

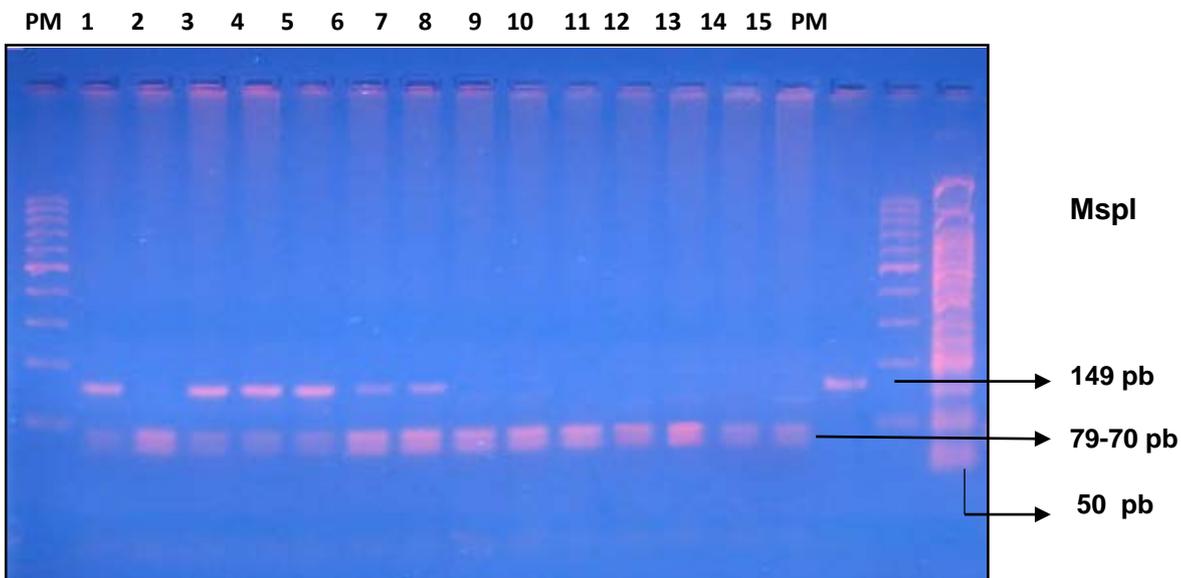


Poliacrilamida 10%. En el mismo se muestra la digestión de 11 muestras con la enzima Nla III (A) y Mnl I (B). A) En el carril 1 se visualiza el marcador de peso molecular (PM) utilizado (Bioline, HyperLadder 50bp, 50-2000 bp). Ninguna muestra tiene el patrón característico de corte de ambos alelos (fragmentos de 37pb y 27pb). En las muestras 2, 3, 7, 11, 13, 14 y 16 se puede ver que uno de los alelos fue digerido (por lo que vemos las bandas de 37pb y 27pb) y el otro no (por lo que vemos el amplicón completo de 64pb). En la muestra 10, 12 y 15 ninguno de los alelos fueron cortados por lo que únicamente podemos ver una banda sin digerir de 64pb. B) Ninguna muestra tiene el patrón característico de corte de ambos alelos (fragmentos de 42pb y 23pb). En las muestras 2, 3, 7, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 ninguno de los alelos fueron cortados por lo que únicamente podemos ver una banda sin digerir de 64pb. En las muestras 10 y 17 se puede ver que uno de los alelos fue digerido (por lo que vemos las bandas de 42pb y la de 22pb no se llega a visualizar bien, pero al tener la primera se sabe que la segunda tendría que estar, pero al ser tan pequeña no se visualiza) y el otro no (por lo que vemos el amplicón completo de 64pb).

Anexo 5

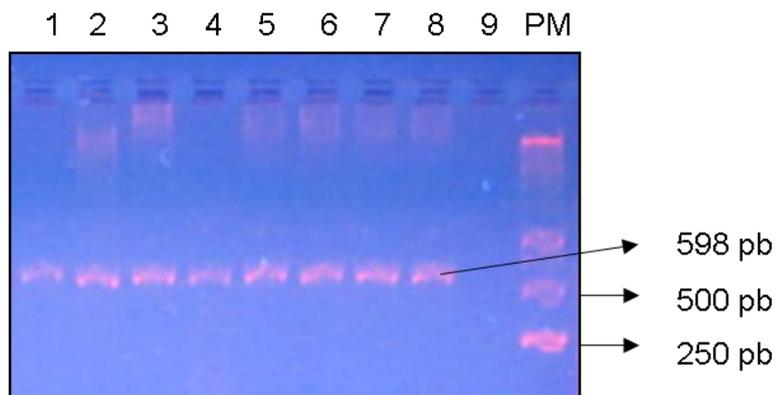


Electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. En el carril número 1 se aprecia el control negativo y en el 10 el marcador de peso molecular (PM) utilizado (Bioline, HyperLadder 50bp, 50-2000 bp), el resto son productos de PCR.

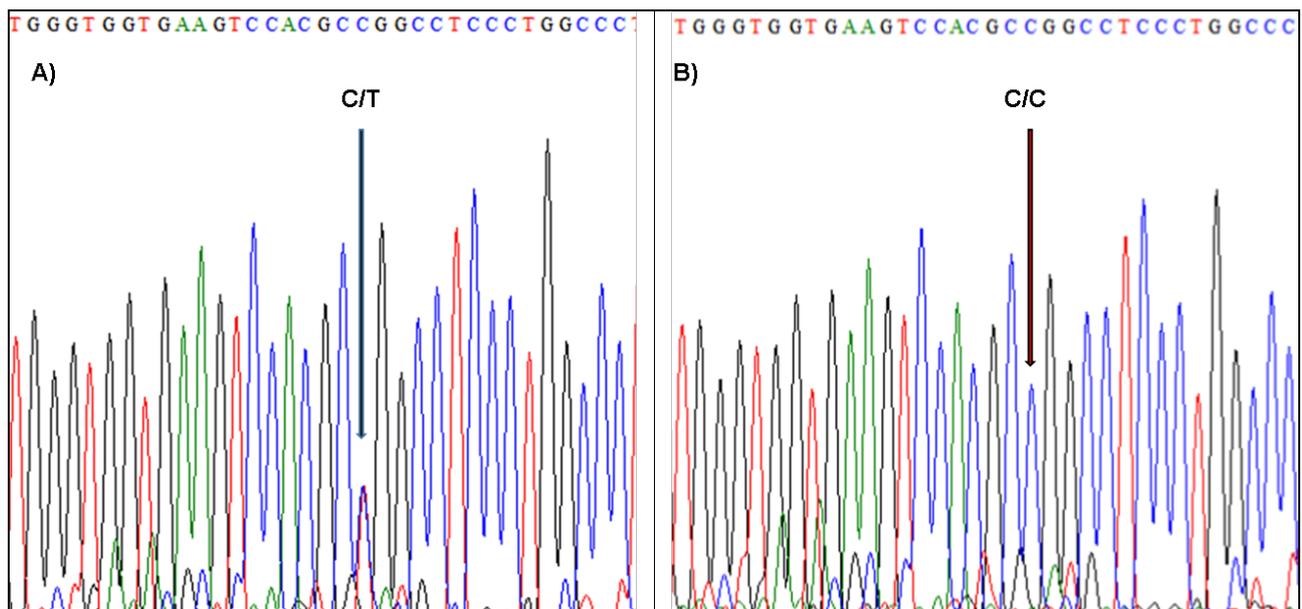


Electroforesis en geles de agarosa al 3%, enzima MspI. En el carril número 1 se aprecia el marcador de peso molecular (PM) utilizado (Thermo Scientific™, 100 bp GeneRuler, 100-1000 bp). Las muestras 1, 3, 4, 5, 6 y 7 según gel se corresponden a individuos heterocigotos donde se puede ver que uno de los alelos fue digerido (por lo que vemos las bandas de 79pb y 70pb) y el otro no (amplicón de 149pb). Pero al enviarlas a secuenciar y contrastar resultados se observó que en 6 y 7 la banda de 149 era más tenue que la digestión (79 y 70 pb) y las muestras resultaron ser homocigotas. El resto de las muestras son homocigotas (DI*B/DI*B) caracterizándose por presentar bandas de 79 y 70 pb. La muestra 15 se corresponde a producto de PCR y los dos últimos carriles son marcadores de peso molecular de 100 y 50 pares de bases. En este se usó el doble de producto para obtener una mejor resolución.

Anexo 6



Electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. En el carril número 9 se aprecia el control negativo y en el 10 el marcador de peso molecular utilizado (PM, Maestrogen, AccuRuler 1Kb Plus DNA, 250pb-1kb), el resto son productos de PCR.



Electroferograma donde se aprecia el polimorfismo para el alelo Di*A y Di*B. A) heterocigota (Di*A/Di*B) y B) homocigota (Di*B/Di*B).