



Licenciatura en
Biología Humana



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



INFORME DE PASANTÍA

Licenciatura en Biología Humana

ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL SISTEMA ABO MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS MOLECULARES.

Br. Estefanía Acosta

Marzo, 2015

Tutor:

Dra. Patricia Esperón

Cátedra de Biología Molecular – Facultad de Química, UdelaR.

Tutor de pasantía:

Dr. Pedro C. Hidalgo

**Departamento de Antropología Biológica, FHUCE. Centro Universitario
de Tacuarembó. UdelaR.**

1.

Agradecimientos

A la Dra. Mónica Sans y al Dr. Pedro Hidalgo por guiarme, abrirme las puertas y dejarme trabajar, equivocarme y compartir en el laboratorio. También al Dr. Gonzalo Figueiro y a Patricia Mut, por escuchar mis incesantes preguntas y ayudarme en este camino.

A la Dra. Adriana Mimbacas, por las muestras brindadas.

A mi familia por su apoyo incondicional y por todo lo que me han enseñado.

A Luis, por acompañarme durante todo este tiempo, ayudarme y estar siempre que lo necesité.

Y a mis amigas de facultad, Gissella y Victoria, por todas esas horas de estudio y de charlas.

Gracias!

2.

Índice

1. Agradecimientos.	pág 2
2. Índice.	pág. 3
3. Resumen.	pág. 4
4. Introducción.	pág. 5
4.1 Características Moleculares.	pág. 5
4.2 Distribución del sistema ABO en el Uruguay.	pág. 7
5. Objetivos.	pág. 9
5.1. Objetivo general.	pág. 9
5.2. Objetivos específicos.	pág. 9
6. Materiales y métodos.	pág. 10
7. Resultados.	pág. 15
7.1. Extracción de ADN.	pág. 15
7.2. PCR-RFLP.	pág. 15
7.3. Análisis estadístico de los datos.	pág. 19
8. Discusión.	pág. 23
9. Conclusiones.	pág. 26
10. Bibliografía.	pág. 27
11. Anexos.	pág. 30
11.1 Extracción y purificación de ADN en pelo (Hidalgo et al. 2009).	pág. 30
11.2 Protocolo de extracción de ADN de saliva (Dr. Bernardo Bertoni, comunicación personal).	pág. 32
11.3 Cálculo de frecuencias.	pág. 33

3.

Resumen

El grupo sanguíneo ABO se caracteriza básicamente por la presencia de dos antígenos: A y B, los cuales son responsables por los cuatro fenotipos principales: A, B, AB y O. Los antígenos son glicoproteínas que se encuentran en la superficie de los glóbulos rojos y otras células del organismo.

La determinación y clasificación de este grupo sanguíneo tiene gran interés en varios campos científicos. Por ejemplo, en medicina clínica por su importancia en las transfusiones sanguíneas, en antropología, para comprender la historia evolutiva de una población, y también para la salud, por su relación con algunas enfermedades que se ha demostrado se asocian a ellos. Recientemente se agregó el conocimiento molecular de los alelos, lo que incorpora aún más información.

Por esto, el objetivo de este trabajo fue determinar las frecuencias genotípicas y de las variantes moleculares del alelo O de este sistema en la población uruguaya, ya que no existe información al respecto.

Se estudió la distribución de los alelos moleculares del sistema sanguíneo ABO en una muestra de 50 individuos residentes en Montevideo, y la relación de su distribución con respecto a otras poblaciones. Para esto se utilizaron las técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la caracterización de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (RFLP).

La muestra estudiada se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. La mayor frecuencia corresponde a los alelos O en su conjunto, con una frecuencia de 0,62 (alelos $O_1=0,39$, $O_{1v}=0,22$ y $O_2=0,01$), mientras que el alelo A le sigue en frecuencia, con 0,31. Es importante enfatizar la detección de los distintos alelos mediante la técnica utilizada así como la detección de genotipos heterocigotos.

Este estudio tiene como aporte que es la primera vez que se realiza el análisis del sistema ABO por técnicas moleculares en la población uruguaya.

Palabras Claves: PCR-RFLP, Distancias genéticas, Frecuencias genotípicas, Frecuencias alélicas, Población de Montevideo.

4.

Introducción

El conocimiento de las frecuencias de los alelos A, B y O del sistema ABO en una población tiene interés tanto para la genética de poblaciones, ya que contribuye al análisis de procesos microevolutivos, como para la historia, en cuanto permite detectar componentes poblacionales, y la salud, puesto que existen enfermedades asociadas a estos.

En las poblaciones que habitaron América predominaba el alelo O, discutiéndose si a América del Sur habrían llegado otros alelos; actualmente las poblaciones originarias solo presentan ese alelo (Crawford, 1992,1998). Según Daniels (2009) existe una alta frecuencia del alelo O (> 0.7) en poblaciones aborígenes de América, Australia y partes de África, pero no existe en la mayoría de Europa o Asia. La frecuencia de A es relativamente alta (0,25-0,55) en Europa mientras que B disminuye desde 0,15 en el Este hasta un 0,05 en Holanda y Francia. Altas frecuencias de B son encontradas en Asia (0,2-0,3) mientras que casi no se encuentra presente en nativos americanos y en la mayoría de los aborígenes australianos.

4.1

Características Moleculares:

El grupo sanguíneo ABO fue identificado en 1900 por K. Landsteiner, con lo cual se iniciaron los estudios a nivel inmunológico sobre sistemas sanguíneos. Fue recién a partir de la década de 1950 que la estructura de los antígenos empezó a ser comprendida. Los antígenos son glicoproteínas que se encuentran en la superficie de los glóbulos rojos y otras células del organismo. Para identificar el grupo sanguíneo ABO se emplean básicamente dos antígenos: anti-A y anti-B. La aglutinación de los antígenos con los eritrocitos determina la identificación de los cuatro fenotipos: A, B, AB y O (Tabla 1).

Fenotipo	Anti-A	Anti-B	Genotipo
A	+	-	AA ó AO
B	-	+	BB ó BO
AB	+	+	AB
O	-	-	OO

Tabla 1. Determinación de Fenotipo mediante la reacción antígeno-anticuerpo.

En el fenotipo AB se produce el fenómeno de codominancia (ambos antígenos están presentes) mientras que el fenotipo 0 está determinado por la ausencia de los antígenos A y B (Daniels, 2002).

A nivel inmunológico, los antígenos A y B son sintetizados por la glicosiltransferasa A y la glicosiltransferasa B, estas enzimas tienen como función transferir un oligosacárido a un residuo aminoácido localizado en una secuencia consenso de la proteína a glicosilar. Las enzimas transferasas de A y B son las que se encargan de transferir el monosacárido al antígeno H (en este caso, el sustrato aceptor). En el fenotipo 0 no hay una enzima activa, por lo que el antígeno H en este caso permanece sin modificaciones (Daniels, 2009).

Los trabajos de Yamamoto et al. (1990) y Hummel et al. (2002) permitieron una mejor resolución a nivel molecular, sistematizándose la nomenclatura de los alelos moleculares del sistema ABO en 2002 (Yip, 2002). A este nivel, el locus del gen ABO se encuentra en el brazo largo del cromosoma 9 y tiene aproximadamente 18 kb. Consiste de 7 exones que varían en el rango de tamaño desde 29 a 688 pb. Los exones 6 y 7 codifican el 77% de la región codificable y el 91% de la región catalítica activa de la transferasa (Yip, 2002). Gracias a los estudios moleculares se ha demostrado que el grupo sanguíneo 0 es causado por una delección de la guanina en la posición 261 cercana a la terminación N de la proteína lo que produce un desplazamiento del marco de lectura y la traducción en una proteína completamente diferente que no tiene la capacidad de modificar el antígeno H (Yamamoto et al. 1990), (Ver Tabla 2).

Exón	6		7													
Nucleótido	261	297	467	526	646	657	681	703	771	796	802	803	829	930	1061	1096
A	G	A	C	C	T	C	G	G	C	C	G	G	G	G	C	G
B		G		G		T		A		A		C		A		A
01	-															
01v	-	G			A		A		T				A			
02		G		G							A					A

Tabla 2. Variaciones en la secuencia de los alelos A, B, 01, 01v y 02. Se indica la posición de los nucleótidos que varían, teniendo como referencia el alelo A. El guión (-) indica una delección. Tabla modificada de Yip, 2000.

Se han encontrado alrededor de 40 variantes del alelo 0 que producen una transferasa inactiva. Los alelos más comunes se pueden englobar en dos familias: la familia perteneciente al

alelo O 101, el cual presenta la delección de la guanina en la posición 261 y dentro ella se encuentran 18 alelos (que comparten esta delección), y la familia del alelo O 102 el cual se diferencia del O 101 por nueve sustituciones puntuales, esta familia está formada por 13 alelos. Los otros alelos corresponden a variantes que no presentan la delección de la guanina (Yip, 2002). Existen también, variantes del alelo A y menos comunes, del B.

Si bien existe información en Uruguay sobre los grupos sanguíneos a nivel inmunológico aún estos no han sido estudiados desde el punto de vista molecular. Es necesario el conocimiento de los genotipos que determinan los grupos más frecuentes en la población ya que estos pueden ser de alto valor en estudios de salud. Hay estudios de enfermedades relacionadas a los distintos fenotipos de los grupos sanguíneos que se han encontrado en algunos lugares si y en otros no. Por ejemplo, el cáncer gástrico es 20% más frecuentes en personas con grupo sanguíneo A, mientras que las úlceras gástricas y duodenales son más frecuentes en las personas con grupo sanguíneo O (Arbeláez García, 2009). Esto permitiría plantear la hipótesis de que el genotipo, o el alelo en sí mismo, que determina el grupo sanguíneo ABO estaría involucrado, lo que explicaría por qué en ciertas poblaciones se muestra diferentes prevalencias para las enfermedades señaladas.

4.2

Distribución del sistema ABO en el Uruguay:

Estudios anteriores hechos en Montevideo señalan que el fenotipo O en una muestra de 496 individuos tenía una frecuencia de 49%, mientras que fue de 39% el fenotipo A y de 9% el B; la alta frecuencia del alelo O se relaciona probablemente con aporte indígena a la población. Esto es corroborado con otros sistemas de grupos sanguíneos como por ejemplo los sistemas MN, Rh, Kell, Duffy, etc. (Sans et al. 1993). Estos estudios, así como distintos estudios previos fueron hechos en base a reacciones de aglutinación antígeno-antisuero. En el trabajo de Sans (1991), se comparan las frecuencias obtenidas para Uruguay, con los datos obtenidos para las poblaciones parentales europeas (España, Portugal e Italia), africanas (África sub-sahariana) e indígenas de América del Sur. Las frecuencias génicas obtenidas de los alelos del sistema ABO se encuentran dentro de los valores observados en las poblaciones parentales europeas. El mismo resultado fue encontrado cuando se analizaron otros sistemas sanguíneos (Tabla 3).

Sistema	Uruguay %	Población europea		Población africana		Indígenas sudamericanos	
		máx	mín	máx	mín	máx	mín
I*A	23.77	30.14	22.47	21.60	4.96	20.30	0.00
I*B	6.23	10.44	1.30	18.80	6.40	10.20	0.00
I*O	70.00	74.53	65.01	88.64	66.40	100.0	79.70

Tabla 3. Frecuencia de los alelos del sistema ABO en Uruguay y máximos y mínimos de sus poblaciones parentales.
Tabla tomada de Sans, 1991.

En cuanto al estudio de los sistemas sanguíneos en la población uruguaya, Sans et al. (1997) han demostrado que la proporción relativa en la contribución genética es: Europea 64%, Africana 7%, e Indígena 1% en el sur, mientras que en Tacuarembó es: Europea 65%, Africana 15%, e Indígena 20%, concluyéndose que la población del Uruguay es básicamente trihíbrida. Por otra parte, el único estudio hecho en nuestro país basado en el estudio de varios loci de ADN nuclear, reveló un aporte indígena del 10% y uno africano del 6% (Hidalgo et. al. 2005).

5.

Objetivos

5.1

Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la población de Montevideo en cuanto a la frecuencia de los alelos que determinan el grupo sanguíneo ABO, por técnicas moleculares.

5.2

Objetivos específicos

- 1) Poner a punto la técnica de determinación de los alelos moleculares del sistema ABO en muestras de cabello y saliva.
- 2) Determinar los genotipos en las muestras obtenidas.
- 3) Calcular las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas.
- 4) Analizar y comparar los datos obtenidos con los datos ya existentes para otras poblaciones.

6.

Materiales y Métodos

Se utilizó una muestra de 50 individuos, mayores de edad, residentes en la ciudad de Montevideo, a quienes se les realizó un cuestionario para relevar datos sobre su ancestría, así como lugar, fecha de nacimiento y grupo sanguíneo (si la persona tenía conocimiento del mismo). Previo a la extracción de la muestra, obtenidas a partir de cabello y saliva, se obtuvo su consentimiento informado, poniendo en conocimiento de los individuos el objetivo de este trabajo y asegurándose la confidencialidad de los datos y el acceso a los resultados una vez finalizada la investigación.

La utilización de los protocolos de obtención y tratamiento de muestras y datos fue aprobado por la Comisión de Ética de la Investigación Científica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación de la Universidad de la República (Expediente N° 120021-000290-13). La extracción de ADN y el tratamiento de las muestras se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de ADN del Departamento de Antropología Biológica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Udelar.

Se utilizaron dos técnicas de extracción de ADN, la primera, a partir de cabello (se utilizó específicamente el folículo piloso del mismo), siguiendo el protocolo sugerido por Hidalgo et al. (2009). La segunda técnica de extracción es a partir de saliva y para esto se utilizó el protocolo del Dr. B. Bertoni (comunicación personal). (Ver Anexos, 11.1 y 11.2).

Una vez realizada la extracción las medidas de concentración de ADN fueron obtenidas mediante espectrofotometría. Se utilizó el espectrofotómetro NanoVue™ (GE, modelo 4282 v1.7.3), que mide la absorción de luz a través de un paso óptico o capa absorbente. Con este instrumento se puede medir la concentración en solución de varios tipos de biomoléculas. Para esto se utiliza la Ley de Lambert-Beer que relaciona el espesor de la capa absorbente con la concentración de cada especie:

$$\text{Log } \frac{I_0}{I} = \epsilon c l$$

I_0 es la intensidad de luz incidente.

I es la intensidad de luz transmitida.

ϵ es el coeficiente de extinción molar.

c es la concentración de la especie absorbente

l es el paso óptico de la muestra que absorbe luz.

A partir de esta ley se establece que la absorbancia es proporcional a la concentración. Una unidad de absorbancia equivale a 50 mg/ml de ADN doble hebra. Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta a 260nm y las proteínas (principalmente los residuos aromáticos que las forman) tienen su máximo de absorbancia a 280nm, por lo que para determinar la pureza de la muestra se debe tener en cuenta que la relación de absorbancia A260/A280 se encuentre entre 1,7 y 1,9.

Para la caracterización molecular de los distintos alelos del grupo 0 se utilizó el protocolo utilizado por Hummel et al. (2002). Este método se basa en el empleo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la caracterización de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (RFLP).

Las condiciones utilizadas en la PCR fueron las descritas por Hummel et al. (2002), ajustadas experimentalmente a nuestras condiciones. Se utilizó la ADN polimerasa Taq Platinum, con su respectivo Buffer, BSA (Bovine Serum Albumin) 20 mg/ml, MgCl con una concentración 50mM y dNTPs con una concentración de 10mM. Para el exón 6 se utilizó un programa de 40 ciclos con una temperatura de hibridación de 56°C mientras que para el exón 7 se usaron la misma cantidad de ciclos pero una temperatura de hibridación de 63°C.

Para verificar el resultado de las PCR se utilizaron geles de Agarosa, con una concentración al 2%. Cada corrida electroforética tuvo un tiempo de 40 minutos a un voltaje constante de 100 V y en las mismas se incluyeron los controles negativos correspondientes. Para la visualización de los productos de PCR, se usó Bromuro de Etidio y para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó el marcador de peso molecular O'Range Ruler 50pb (pares de bases).

Las enzimas utilizadas para la caracterización fueron: Rsa I, HpyCH4 IV, Nla III y Mnl I. Las mismas se usaron en las condiciones recomendadas por los fabricantes (Hummel et al. 2002). Los fragmentos obtenidos, correspondientes al exón 6 y al exón 7, se describen en la Tabla 4.

Cromosoma 9	Exón 6		Exón 7	
Tamaño amplicón	103/104 pb		64 pb	
Enzima utilizada	Rsa I	HpyCH4IV	Nla III	Mnl I
Fragmento obtenido	66+37 pb	73/72+31 pb	37+27 pb	42/41+23/22 pb
Alelo	261 pn	297 pn	796 pn	802 pn
A	G	A	C	G
B	G	G	A	G
01	(-)	A	C	G
01v	(-)	G	C	G
02	G	G	C	A

Tabla 4. En la misma se indican los tamaños de los amplicones esperados para cada uno de los exones así como los fragmentos que se obtendrían una vez digeridos los productos de PCR. Se indica para cada alelo el sitio de restricción que reconoce cada enzima. Figura obtenida y modificada de Hummel et al. 2002. (pb: pares de bases; pn: posición del nucleótido; (-): delección).

Para distinguir los fragmentos las muestras digeridas se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% y la visualización de los mismos se hizo en base al protocolo de Sanguinetti et al. (1994) mediante la tinción del gel con nitrato de plata. Se esperan obtener los siguientes patrones de corte según los alelos ya identificados (Hummel et al., 2002):

Fenotipo	Genotipo	Rsa I	HpyCH4IV	Nla III	Mnl I
A	A A	-/-	-/-	o	o
A	A 01	+/-	-/-	o	o
0	01 01	+/+	-/-	o	o
0	01 01v	+/+	+/-	o	o
0	01v 01v	+/+	+/+	o	o
A	A 02	-/-	+/-	-/-	+/-
AB	A B	-/-	+/-	+/-	-/-
0	02 02	-/-	+/+	-/-	+/+
B	B 02	-/-	+/+	+/-	+/-
B	B B	-/-	+/+	+/+	-/-
A	A 01v	+/-	+/-	-/-	-/-
0	01 02	+/-	+/-	-/-	+/-
B	B 01	+/-	+/-	+/-	-/-
0	01v 02	+/-	+/+	-/-	+/-
B	B 01v	+/-	+/+	+/-	-/-

Tabla 5. (-/-) Se utiliza para indicar que la enzima no digirió el fragmento. (+/-) Indica que uno de los alelos fue digerido mientras que el otro no. (+/+) La enzima digirió completamente el producto de PCR. (o) Indica que la digestión por esas enzimas no son necesarias para el análisis de esos alelos ya que pueden ser identificados solamente por las primeras dos enzimas.

Una vez obtenidos los resultados se realizó el análisis estadístico de los mismos. Las frecuencias genotípicas fueron calculadas por observación directa (Li, 1976), y a partir de ellas se calcularon las frecuencias alélicas utilizando el modelo de Hardy-Weinberg. Se utilizó el programa informático GenAEx 6.5 (Peakall et al., 2012) para verificar si la población se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El análisis de las distancias genéticas con diversas poblaciones mundiales (Ver tabla 6) se realizó con dos programas distintos. Por una parte se analizaron ocho poblaciones con los datos

para los cinco alelos estudiados (A, B, 01, 01v y 02). Se usó el programa Arlequín 3.5 (Excoffier et al., 2005), el cual utiliza la distancia de Reynolds (Reynolds et al. 1983) y el índice Fst como medida de la diferenciación genética. Realiza la comparación de todos los pares de poblaciones correlacionando la distancia genética con la divergencia de las poblaciones en un período corto de tiempo. El segundo estudio fue realizado en el paquete estadístico R 3.1.2 (R Core Team, 2014) que utiliza la distancia de Rogers (Rogers, J. 1972), la misma es una modificación de la distancia geométrica y puede tomar valores entre 0 y 1. En este caso, se compararon 14 poblaciones utilizando cuatro alelos. Se usó la frecuencia en conjunto de los alelos 01 y 01v ya que los mismos comparten la delección de la Guanina en la posición 261.

Para distinguir entre los grados de diferenciación genética se utilizaron los criterios de S. Wright (1978) para interpretar los valores del índice Fst, que los categoriza de la siguiente manera: de 0 a 0.05 diferencia pequeña, de 0.05 a 0.15 diferencia moderada, de 0.15 a 0.25 diferencia grande, y mayor a 0.25 diferencia muy grande. El índice de Fst puede tomar valores entre 0 y 1, por lo que a mayor valor del índice de Fst, mayor diferenciación.

Poblaciones	N	Frecuencias alélicas					Referencias bibliográficas
		A	B	01	01v	02	
Chinos	125	0,192	0.1680	0,418	0,39	0	Yip et al. 2000.
Europeos	98	0,2143	0.1276	0,4877	0,28	0,018	Yip et al. 2000.
Región amazónica brasilera	142	0,13	0,11	0,73	0,03	0	Carvalho et al. 2010
New Georgia (Is. Salomón)	131	0,24	0,1	0,54	0,12	0	Ohashi et al. 2006
Japoneses	262	0,284	0,271	0,199	0,246	0	Ogasawara et al. 1996.
Península Ibérica	440	0,33	0,082	0,37	0,209	0,009	Fregel et al. 2009
Marroquíes	138	0,217	0,145	0,362	0,254	0,022	Fregel et al. 2009
Berbers (África del Norte)	84	0,226	0,107	0,31	0,333	0,024	Fregel et al. 2009
Mauritaníes	60	0,184	0,133	0,333	0,333	0,017	Fregel et al. 2009
Kuwait	335	0,1338	0,1676	0,6831		0,0155	El-Zawahri et al. 2008
Alemanes	169	0,29	0,0473	0,642		0,0207	El-Zawahri et al. 2008
Ingleses	86	0,273	0,105	0,605		0,017	El-Zawahri et al. 2008
Suecos	150	0,2633	0,1033	0,6001		0,0333	El-Zawahri et al. 2008

Tabla 6. Datos de las frecuencias alélicas del sistema ABO en diversas poblaciones mundiales. En la misma se indican las referencias bibliográficas correspondientes.

Los resultados de este análisis se procesaron de dos maneras: mediante el método de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés: Principal Coordinates Analysis), el cual permite representar similitudes y/o diferencias entre un set de datos. Este método 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. Para realizar el PCoA se utilizó el paquete estadístico R 3.1.2 (R Core Team, 2014). La otra manera fue realizando la representación de los datos donde a los valores de distancias (tanto de Reynolds como de Rogers) se les asignó un código de color, diferenciado por rango de valores, para lograr una rápida identificación visual de la diferencia entre los mismos.

7.

Resultados

7.1

Extracción de ADN:

Con ambas técnicas utilizadas se logró extraer ADN aunque con el protocolo que usa saliva se obtuvieron mejores resultados ya que las concentraciones conseguidas fueron mayores. La extracción de ADN a partir de cabello tiene como principal desventaja que, en muchos casos, los cabellos se encuentran tratados químicamente y esto determina que el ADN sea fácilmente degradado o alterado por estos compuestos químicos.

7.2

PCR-RFLP:

Si bien no se logró estandarizar las medidas de concentración obtenidas mediante espectrofotometría, ambas técnicas permitieron realizar PCR exitosas, como se muestra en la Figura 1.

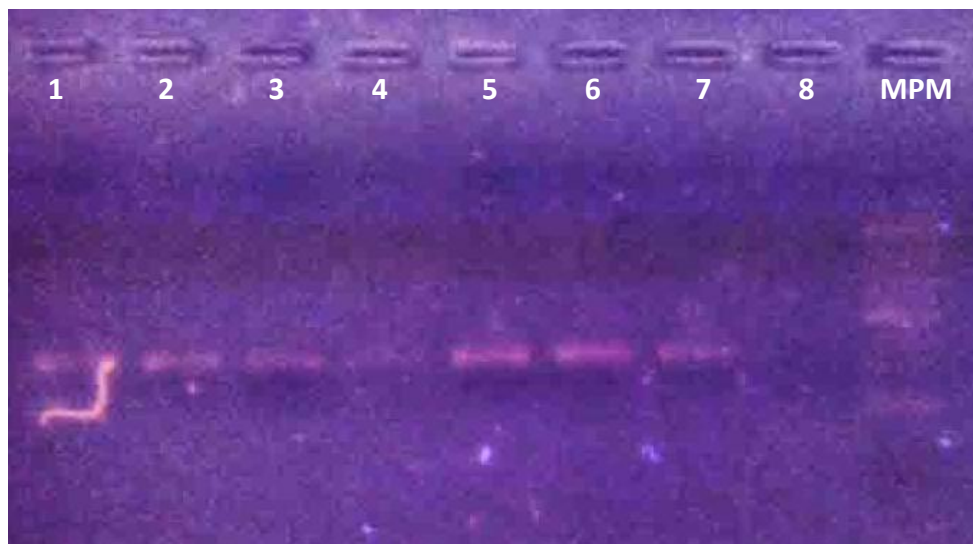


Fig.1. Gel de Agarosa al 2%, en el que se observa la presencia de productos de PCR del exón 7, un fragmento de 64pb. Los carriles 1,2,5 y 6 corresponden a amplificaciones de extracciones de ADN de saliva mientras que los carriles 3, 4 y 7 corresponden a amplificaciones de extracciones de ADN de cabello. El carril 8 corresponde al control negativo (agua) y en el último se muestra el marcador de peso molecular (MPM).

En la tabla 7 se indican los patrones obtenidos para las muestras estudiadas.

ID	Rsa I	HpyCH4 IV	Nla III	Genotipo
AM 2	+/+	-/-		01 01
GF	+/+	-/-		01 01
KC 30	+/+	-/-		01 01
KC 31	+/+	-/-		01 01
TBA 9358	+/+	-/-		01 01
AM 17	+/+	+/-		01 01v
AM 20	+/+	+/-		01 01v
CON 8110	+/+	+/-		01 01v
CON 9438	+/+	+/-		01 01v
EAM 6043	+/+	+/-		01 01v
KC 94	+/+	+/-		01 01v
MS	+/+	+/-		01 01v
VAS 1014	+/+	+/-		01 01v
CON 9687	+/+	+/-		01 01v
AM 13	+/+	+/+		01v 01v
GGH 2894	+/+	+/+		01v 01v
RFT 1133	+/+	+/+		01v 01v
VAS 1981	+/+	+/+		01v 01v
VAS 4879	+/+	+/+		01v 01v
AM 14	+/-	+/+	-/-	01v 02*
AM 1	+/-	-/-		A 01
AM 3	+/-	-/-		A 01
AM 5	+/-	-/-	-/-	A 01
AM 9	+/-	-/-	-/-	A 01
AM 10	+/-	-/-		A 01
AM 11	+/-	-/-		A 01
AM 18	+/-	-/-		A 01
CON 3602	+/-	+/-	-/-	A 01

CON 9427	+/-	-/-		A 01
GMP 1733	+/-	-/-		A 01
MRD 6505	+/-	-/-		A 01
RLC 2058	+/-	-/-		A 01
JGO 1112	+/-	-/-		A 01
MAA 1344	+/-	-/-		A 01
AM 15	+/-	-/-		A 01
CON 2585	+/-	-/-		A 01
CON 1467	+/-	-/-		A 01
AM 6	-/-	-/-	-/-	A A
FFB 8829	-/-	-/-		A A
MIP 3238	-/-	-/-		A A
PH	-/-	-/-		A A
CON 8535	-/-	-/-		A A
VAS 2795	-/-	-/-		A A
AM 8	-/-	+/-	+/-	A B
KC 16	-/-	+/-	+/-	A B
CON 0993	+/-	+/-	+/-	B 01
LCB 2993	+/-	+/-	+/-	B 01
CON 1581	+/-	+/-	+/-	B 01
AM 12	+/-	+/+	+/-	B 01v
NRC 2776	+/-	+/+	+/-	B 01v

Tabla 7. Se muestran las 50 muestras analizadas, en la misma se pueden ver los patrones de corte característico de cada enzima para cada fragmento en particular. En la última columna se detallan los genotipos obtenidos. * Para la muestra AM14 no fue necesaria la digestión con Mnl I. Su genotipo se pudo determinar con las otras tres enzimas, ya que el patrón de digestión obtenido es único para ese genotipo. ** Hubieron cuatro muestras que no se agregaron a la lista de resultados ya que fueron enviadas a secuenciar para corroborar su genotipo. Las mismas corresponden a los patrones que solo difieren en el resultado de la enzima Mnl I. Los genotipos posibles son A01v y 0102, dada la baja frecuencia del alelo 02, es muy probable que las muestras sean efectivamente A01v y es por esto que en la lista ninguno de los individuos presenta este genotipo.

Al analizarse el exón 7 para corroborar los resultados, hubieron cuatro casos en los que no se obtuvieron datos consistentes cuando se utilizó el protocolo sugerido por Hummel et al. (2002). En todas las digestiones realizadas con la enzima Mnl I se obtuvieron cortes en los fragmentos de las muestras estudiadas. El corte del fragmento determina la presencia del alelo 02, dada la baja

frecuencia de este alelo, se descartaron estos resultados y es por esta razón que se diseñaron un par nuevos de primers para el exón 7. Los mismos permitieron amplificar una región más amplia. Posteriormente se obtuvieron resultados satisfactorios, corroborando los resultados ya obtenidos con el exón 6.

ABO-exón 7-forward: GGAGGCCTTCACCTACGAG

ABO-exón 7-reverse: CAAGAGGTGCAGCGGCTC

El fragmento obtenido con estos primers tiene un tamaño de 118 pb (en rojo y negrita se resaltan los primers utilizados):

GGAGGCCTTCACCTACGAGCGCCGGCCCCAGTCCCAGGCCTACATCCCCAAGGACGAGG
GCGATTCTACTACATGGGGGCGTTCTTCGGGGGGTTCGGTG**CAAGAGGTGCAGCGGCTC**

La enzima Nla III tiene un solo sitio de corte, por lo que genera dos fragmentos: uno de 76pb y uno de 42pb:

- GGAGGCCTTCACCTACGAGCGCCGGCCCCAGTCCCAGGCCTACATCCCCAAGGACGAGGGCGATT TCTACTACATG (76 pb).
- GGGGCGTTCTTCGGGGGGTTCGGTGCAAGAGGTGCAGCGGCTC (42 pb).

En caso de no ser un alelo B, entonces no se producen cortes.

La enzima Mnl I, que identifica alelos 02, presenta tres sitios de cortes generando cuatro fragmentos: uno de 49pb, uno de 25pb, uno de 23pb y uno de 21pb:

- GGAGGCCTTCACCTACGAGCGCCGGCCCCAGTCCCAGGCCTACATCCCC (49 pb).
- CATGGGGGCGTTCTTCGGGGGGTTCG (25 pb).
- AAGGACGAGGGCGATTCTACTA (23 pb).
- GTGCAAGAGGTGCAGCGGCTC (21 pb).

En caso de no ser un alelo 02 la enzima igualmente reconoce dos sitios por lo que genera tres fragmentos: uno de 49pb, otro de 48pb y el tercero de 21pb:

- GGAGGCCTTCACCTACGAGCGCCGGCCCCAGTCCCAGGCCTACATCCCC (49 pb).
- AAGGACGAGGGCGATTCTACTACATGGGGGCGTTCTTCGGGGGGTTCG (48 pb).
- GTGCAAGAGGTGCAGCGGCTC (21 pb).

En un principio, para la visualización de los fragmentos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3%, pero para obtener mayor resolución y poder diferenciar fragmentos más pequeños se cambió al protocolo que utiliza la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y su posterior tinción con nitrato de plata. En la Fig. 2 se pueden ver, a modo de ejemplo, los resultados que muestran los patrones de restricción para la enzima Rsa I.

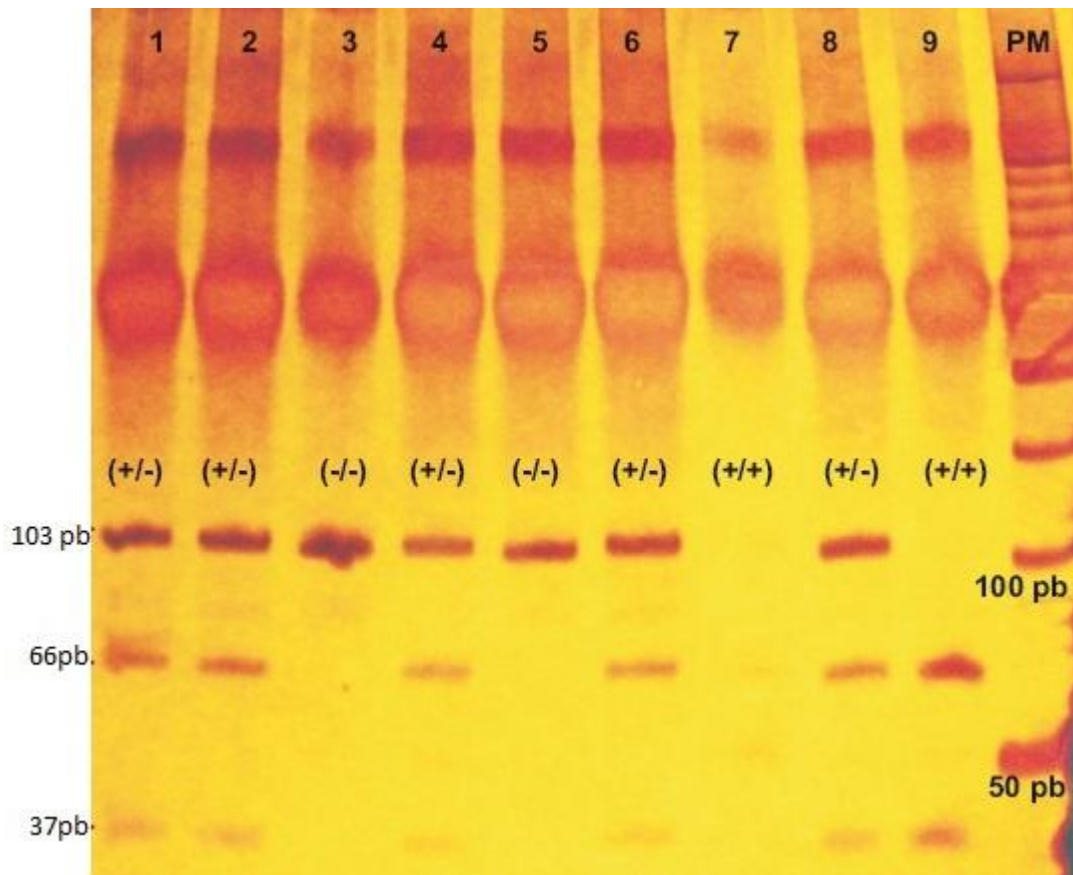


Fig. 2 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

En el mismo se muestra la digestión de 10 muestras con la enzima Rsa I. Las muestras 7 y 9 muestran el patrón característico de corte de ambos alelos (fragmentos de 66pb y 37pb) que determina el alelo O1v. En las muestras 1, 2, 4, 6 y 8 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 103pb), lo que determina el alelo O1. En las muestras 3 y 5 ninguno de los alelos fueron cortados por lo que únicamente podemos ver una banda sin digerir de 103pb, esto determina el alelo A. En el carril 10 se visualiza el marcador de peso molecular (PM) utilizado (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder 50-1000 bp).

7.3

Análisis estadístico de los datos:

Con los datos de los 50 individuos, 100 alelos analizados en total, se hallaron en primer lugar las frecuencias genotípicas, calculadas por observación directa y en segundo lugar las frecuencias alélicas utilizando el modelo de Hardy-Weinberg (Ver anexo 11.3). A partir de estas últimas se determinaron las frecuencias alélicas relativas:

Fenotipo	N	Frecuencias	Alelo	Frecuencias
A	46	0,23	A	0.31
B	10	0,05	B	0.07
AB	4	0,02		
0	40	0,2	01	0.39
			01v	0.22
			02	0.01

Tabla 8. Frecuencias fenotípicas y frecuencias alélicas halladas en este estudio.

Las frecuencias observadas y esperadas de cada genotipo se obtuvieron con el programa GenAlEx 6.5 (ver figura 3). La población se encuentra en Equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=16,738$; $gl=10$; $p=0,080$).

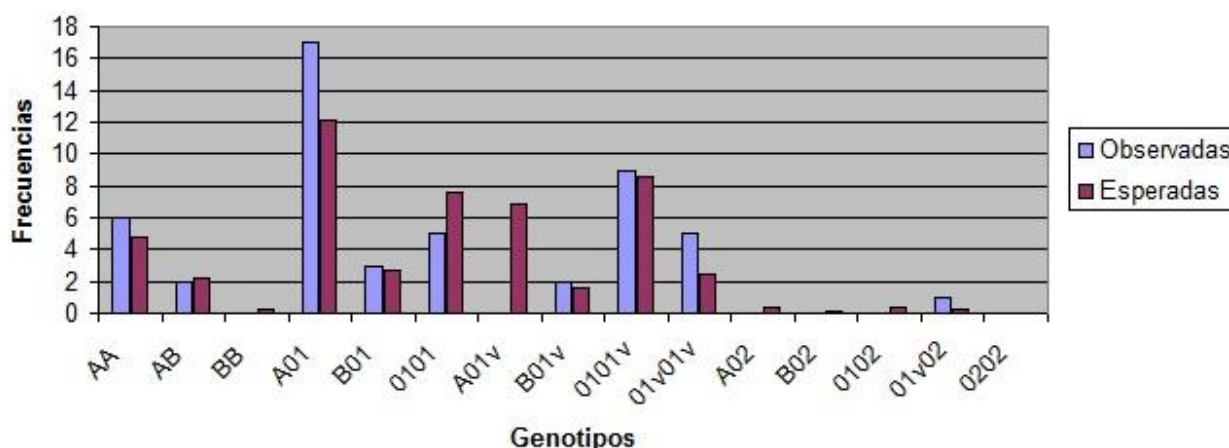


Fig. 3 Comparación de las frecuencias genotípicas observadas y las frecuencias genotípicas esperadas.

Se realizaron dos análisis de distancias genéticas. En el primero se utilizó el programa Arlequín 3.5 que utiliza el índice F_{st} como una medida de distancia. En la comparación de la muestra estudiada (ver Fig. 4, primer columna), donde se estudiaron ocho poblaciones y los cinco alelos encontrados, se observa que la misma presenta diferencias pequeñas de acuerdo a Wright (1978) con la mayoría de las poblaciones con las cuales se comparó (valores de F_{st} menores a 0.02). En este estudio, las mayores diferencias encontradas fueron con la población de la región amazónica brasilera cuyo índice de F_{st} tiene un valor de 0.14, por lo que se ubica en el rango de diferencias moderadas.

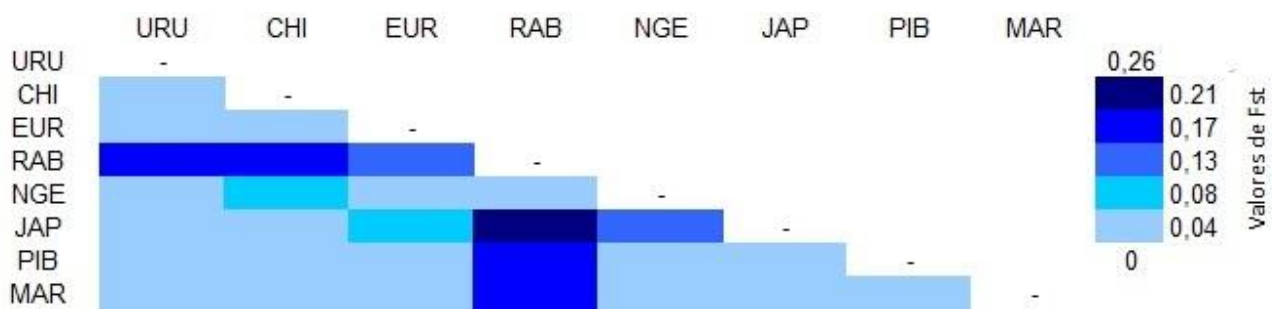


Fig. 4 Visualización gráfica de los valores de Fst en la comparación de cada par de poblaciones estudiadas.
 URU= Uruguay, CHI= China, EUR= Europeos, RAB= Región amazónica brasilera,
 NGE= New Georgia (Is. Salomón), JAP= Japón, PIB= Península Ibérica, MAR= Marroquíes.

En la figura 5 se muestran los resultados del análisis de coordenadas principales, donde se verifica que las poblaciones más similares a la muestra estudiada son las poblaciones de Marruecos y de New Georgia (Islas Salomón), mientras que las más alejadas son las poblaciones de la región amazónica brasilera y de China.

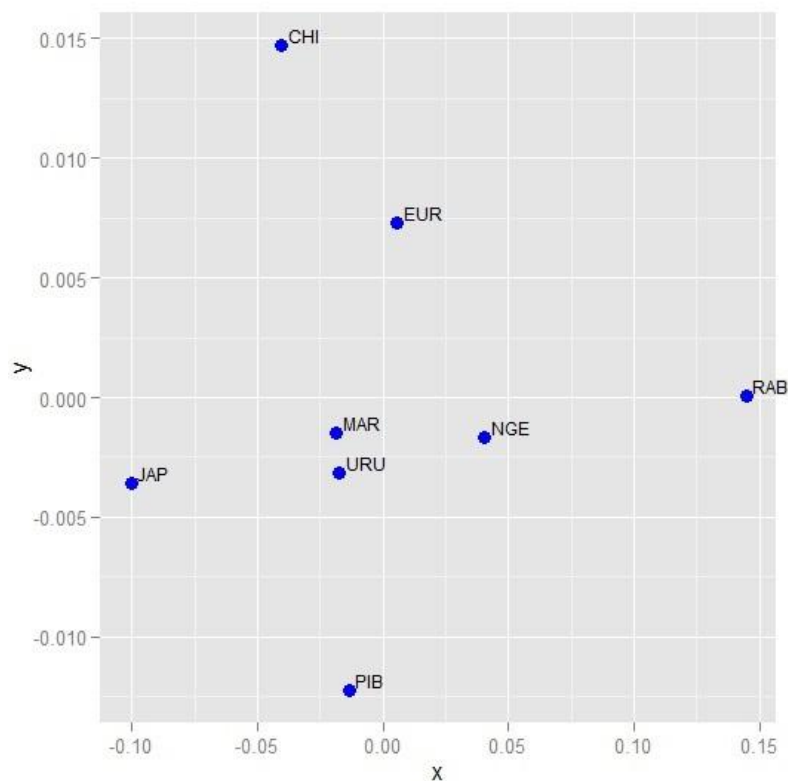


Fig. 5 Representación visual del análisis de coordenadas principales para ocho poblaciones y los cinco alelos estudiados. Los códigos de las diferentes poblaciones son los mismos que los utilizados para la figura 4.

En la visualización gráfica realizada utilizando el segundo set de datos que compara 14 poblaciones y utiliza cuatro de los alelos (A, B, 01+01v y 02) se verifica (ver Fig. 6) que las mayores diferencias se presentan con las poblaciones de Japón y la región amazónica brasilera mientras que con las poblaciones de Suecia, Península Ibérica, Alemania e Inglaterra las distancias serían las más cercanas a la muestra estudiada.

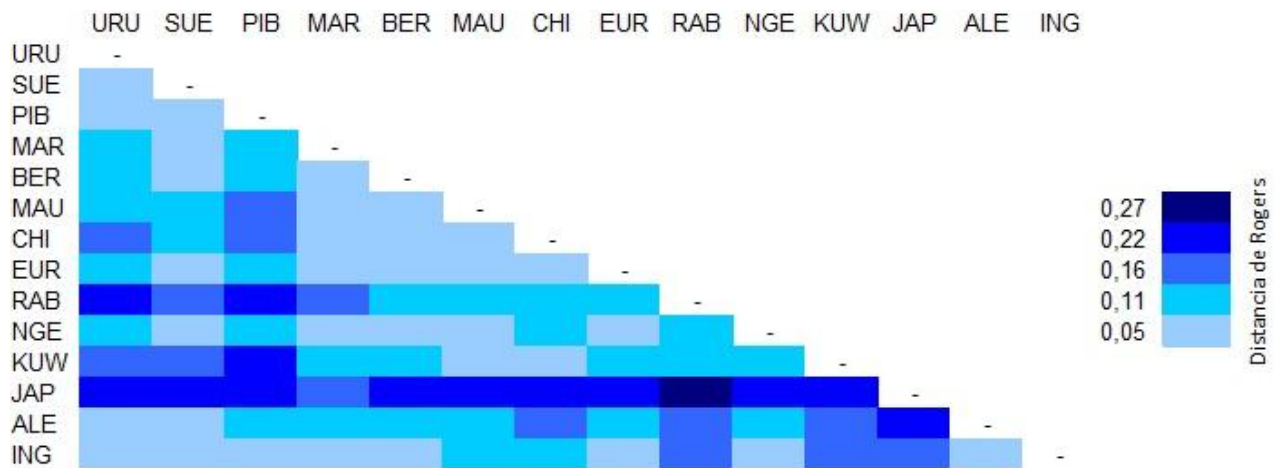


Fig. 6 Visualización gráfica de los valores de la distancia de Rogers en la comparación de cada par de poblaciones estudiadas. URU= Uruguay, SUE= Suecia, PIB= Península Ibérica, MAR= Marruecos, BER= Berbers (África del Norte), MAU= Mauritania, CHI= China, EUR= Europeos, RAB= Región amazónica brasilera, NGE= New Georgia (Is. Salomón), KUW= Kuwait, JAP= Japón, ALE= Alemania, ING= Inglaterra.

En la figura 7 se muestran los resultados del análisis de coordenadas principales del segundo análisis, donde podemos verificar que las poblaciones más cercanas a la muestra estudiada son las poblaciones de la Península Ibérica y Alemania seguido por las poblaciones suecas e inglesas. Las que presentan mayores distancias son, en primer lugar la población japonesa seguido por las poblaciones de Kuwait y de la región amazónica brasilera.

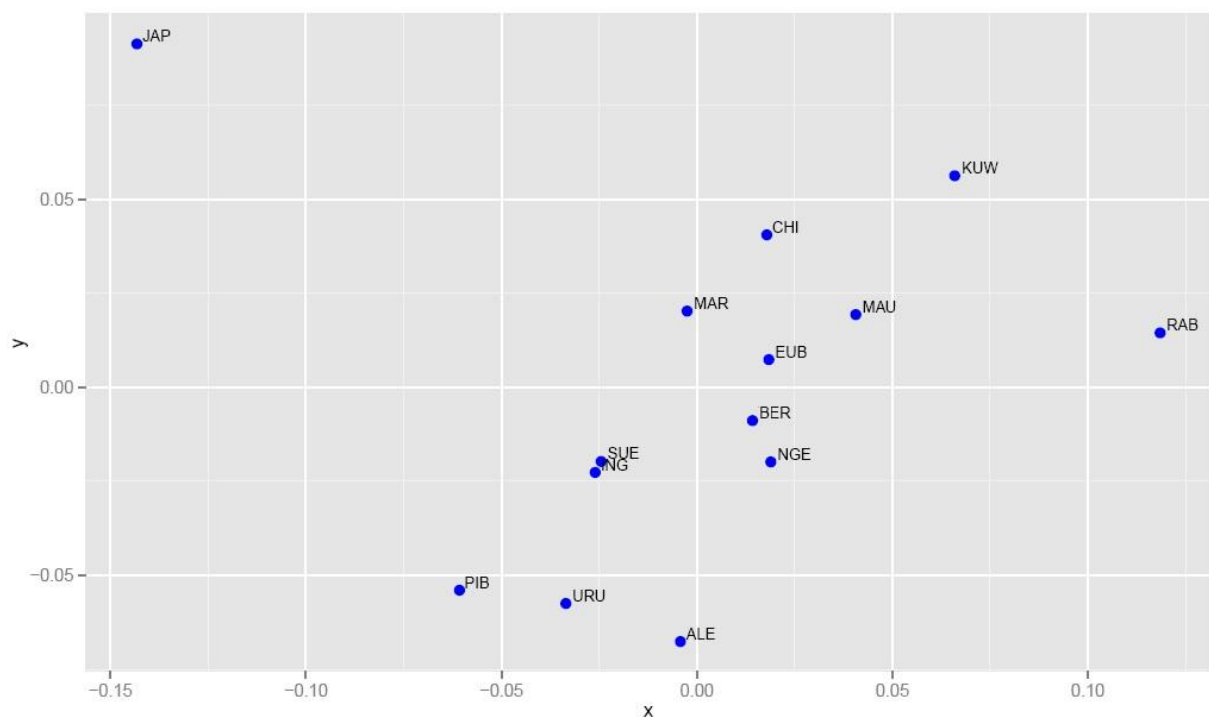


Fig. 7 Representación visual del análisis de coordenadas principales para las 14 poblaciones. Los códigos de las diferentes poblaciones son los mismos que los utilizados para la figura 8.

8. Discusión

La técnica de genotipado y el protocolo utilizados en este estudio detecta las grandes familias de alelos del grupo sanguíneo ABO, lo que permitió obtener datos de alelos moleculares que hasta ahora no habían sido investigados en la población uruguaya. En el estudio se analizaron solamente las variantes del alelo O, por ser el de mayor frecuencia y por tener interés en el estudio de poblaciones prehistóricas americanas. En posteriores estudios se podrían utilizar otras técnicas (por ejemplo, secuenciación) para descubrir variantes raras o nuevas de alelos.

Las frecuencias fenotípicas halladas en diversos estudios realizados sobre el sistema sanguíneo ABO en el Uruguay arrojaron distintas frecuencias. Por ejemplo, Sans (1991) determina: A=38,91, B=9,09, O=48,99 y AB=3,01, mientras que en Baraibar (1961, en Sans 1991) las frecuencias encontradas fueron A=39,92, B=8,97, O=47,9 y AB=3,21 y Surraco et al. (1986, en Sans 1991), determina A=40,49, B=9,05, O=3,03 y AB=47,43.

En el presente estudio las frecuencias fenotípicas halladas fueron: A=46,0, B=10,0, O=40,0 y AB=4,0. Se realizó una comparación entre el promedio hallado en estos tres estudios previos y la muestra estudiada, la diferencia entre las frecuencias no es significativa ($\chi^2=1,13$; gl=2; $p=0,60$), si bien se observa aparentemente un mayor porcentaje de A en detrimento del de O.

Una de las características más importantes de este trabajo es la de poder determinar los alelos moleculares, ya que si bien los datos a nivel inmunológico son de suma relevancia tienen enmascarados la mitad de la información ya que un individuo puede ser fenotípicamente A pero a nivel molecular puede presentar un alelo O, que no se manifiesta, el cual podría influir en otros aspectos. Además, con esta técnica es posible la detección directa de heterocigotos mientras que de otra manera solo es posible hallarlos mediante cálculos estadísticos.

Los estudios realizados en América están dedicados en su mayoría al estudio de poblaciones originarias y en consecuencia, los mismos se centran en los diferentes alelos O (por ser el único alelo existente previo contacto con los europeos). Cabe destacar el trabajo de Estrada-Mena et al. (2010) en poblaciones nativas de Chile, Bolivia, México, Ecuador y Brasil donde recoge datos de variantes raras de alelos O y la frecuencia de los alelos O predominantes en estas poblaciones: O1, O1v y una variante de O1v (G542A, una sustitución del nucleótido G por A en la posición 542). Y también el trabajo de Llop et al. (2006) en poblaciones originarias de Chile donde el alelo O1v tiene mayor frecuencia sobre el alelo O1.

Los datos obtenidos en el primer análisis (Fig. 4) indican que la muestra no presenta grandes distancias con las otras poblaciones estudiadas. Lo cual podría estar influido, en parte, porque el análisis responde a un solo sistema y donde las poblaciones comparadas presentan los mismos cinco alelos. Mediante la categorización de S. Wright podemos interpretar que la mayor de las diferencias se encuentra en el rango de diferencia moderada y ocurre al compararla con la población de aborígenes de la región amazónica brasilera. Esto puede estar influido por la composición de la muestra y por ser un grupo aislado, que podría estar sujeto a deriva génica. Se debe tener en cuenta que la población de la región amazónica brasilera no es una población nativa, si no que es una población mestizada con una probable influencia europea y africana lo que podría explicar el grado de diferenciación que presentó en el análisis. La revisión bibliográfica llevada a cabo en este trabajo confirma los pocos datos a nivel molecular que existen para poblaciones actuales del continente americano, por lo que para análisis más exhaustivo sería necesario la comparación de la muestra estudiada con poblaciones de nuestra región.

En el análisis de coordenadas principales (Fig. 5) no muestran ningún patrón definido, lo cual pudiera deberse a factores aleatorios en la distribución de las frecuencias alélicas de cada población. La posición de la población uruguaya muestra un desplazamiento de las poblaciones europeas (EUR y PIB) pero también de las otras poblaciones consideradas, lo cual podría indicar un cierto nivel de diferenciación.

En el análisis donde se compararon más poblaciones pero menos alelos y se utilizó la distancia de Rogers (Fig. 6) la muestra estudiada presenta las menores diferencias con las poblaciones europeas con las que fue comparada (Suecia, Península Ibérica, Alemania e Inglaterra). La comparación con la población "Europeos" presenta un grado mayor de diferenciación, esto podría explicarse porque la muestra tenga un alto grado de heterogeneidad. La cercanía con las poblaciones europeas puede ser fácilmente explicada por la preponderancia de las mismas en la ancestría de la población uruguaya. Las mayores diferencias se pueden ver con poblaciones asiáticas.

En el PCoA se repiten los patrones de distancia, en la figura 7, se puede observar claramente que las diferencias mayores se encuentran con la población japonesa pero también hay diferencias considerables con las poblaciones africanas y aún mayores con la población de la región amazónica brasilera. Esto no estaría en concordancia con otros estudios, ya que los mismos indican que nuestra población tiene un componente indígena importante seguido por aportes africanos (Sans, 2009).

Existen varios factores que influyen en los estudios con este tipo de muestreo. Por una parte el tamaño de la muestra tiene un peso importante y por otro la elección de los individuos, ya que no debería existir ningún tipo de sesgo en la composición de la misma. En este caso, se llegó a genotipar 100 alelos de individuos, de una muestra de conveniencia de residentes en Montevideo. Esto no asegura que existan sesgos como la clase social o grupo socioeconómico.

La determinación de las variantes moleculares del alelo O también tiene importancia en el análisis de poblaciones prehistóricas. En Uruguay se están llevando a cabo estudios de alelos moleculares del sistema sanguíneo ABO en restos de individuos hallados en el territorio nacional. Este tipo de información contribuye no solo al conocimiento de las poblaciones americanas así como también al desarrollo del poblamiento del continente. Además de aportar datos sobre como y cuando es que desaparecieron los alelos A y B de las poblaciones originarias en América del Sur.

9.

Conclusiones

Estos son los primeros datos obtenidos a nivel molecular sobre alelos que determinan el sistema sanguíneo ABO en Uruguay. Los resultados revelan el peso de los aportes tanto de los distintos alelos O (en conjunto presentan una frecuencia muy alta, de 0,62) como en menor medida el alelo A (con una frecuencia de 0.31), en concordancia con otros estudios realizados en el país.

Cabe destacar la importancia de la detección de los distintos subtipos de alelos hallados, ya que en un futuro, con un mayor registro pueden ser comparados con los de otras poblaciones. En especial por ejemplo, al estudiar el aporte indígena ya que los alelos O encontrados con sus respectivas frecuencias, podrían asemejarse con los de poblaciones originarias americanas, tanto actuales como pasadas. En Uruguay se están llevando a cabo estudios de alelos moleculares en restos de individuos prehistóricos hallados en el territorio, lo que podría aportar información a los procesos microevolutivos que sucedieron en el poblamiento del continente americano.

Las técnicas utilizadas permiten la detección de heterocigotos, lo que no se puede hacer por técnicas directas.

Los datos obtenidos podrían ser utilizados en futuros estudios que los asocien a determinadas enfermedades y/o susceptibilidades a las mismas así como en estudios antropológicos para detectar componentes poblacionales o posibles relaciones de ancestría.

Es de vital importancia continuar con el relevo de este tipo de información para conformar una mayor base de datos, dada la relevancia de este marcador genético en las diferentes disciplinas científicas.

10. Bibliografía

- Arbeláez García, C. 2009. Sistema de grupo sanguíneo ABO. *Medicina & Laboratorio*, 15: 329-347.
- Carvalho, D.B. 2010. Frequency of ABO blood group system polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria patients and blood donors from the Brazilian Amazon region. *Genetics and Molecular Research*, 9: 1443-1449.
- Crawford, MH. 1992. *Antropología biológica de los indios americanos*. Mapfre, Madrid.
- Crawford, MH. 1998. *The origins of Native Americans: evidence from anthropological genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Daniels, G. 2009. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Human Genetics*, 126: 729-742.
- Daniels, G. 2002. *Human blood groups*, 2nd ed. Blackwell Science, Oxford.
- El-Zawahri, M.M. and Luqmani, Y.A. 2008. Molecular genotyping and frequencies of A¹, A², B, O¹ and O² alleles of the ABO blood group system in a Kuwaiti population. *International Journal of Hematology*, 87: 303–309.
- Estrada-Mena, B. F. Javier Estrada, F.J. Ulloa-Arvizu, R. et al. 2010. Blood group O alleles in Native Americans: implications in the peopling of the Americas. *American Journal of Physical Anthropology*, 142: 85-94.
- Excoffier, L. et al. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Fregel, R. Betancor, E. Suárez, N.M. et al. 2009. Temporal evolution of the ABO allele frequencies in the Canary Islands: the impact of the European colonization. *Immunogenetics*, 61: 603–610.

Hidalgo, P.C. Bengochea, M. Abilleira, D. et al. 2005. Genetic admixture estimate in the Uruguayan population based on the loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *International Journal of Human Genetics*, 5: 217–222.

Hidalgo, P.C. Ackermann, E. Figueiro, G. et al. 2009. Extracción y purificación de ADN de pelo a pH muy ácido. *Actas de las Novenas Jornadas Nacionales de Antropología Biológica*, p. 146. Asociación Argentina de Antropología Biológica, La Plata.

Hummel, S. Schmidt, D. Kahle, M. et al. 2002. ABO blood group genotyping of ancient DNA by PCR-RFLP. *International Journal of Legal Medicine*, 116: 327-333.

Li, C. C. 1976. *First Course in Population Genetics* Boxwood Press, PacificGrove.

Llop, E. Henríquez, H. Moraga, M. et al. 2006. Brief communication: Molecular characterization of O alleles at the ABO locus in Chilean Aymara and Huilliche Indians. *American Journal of Physical Anthropology*, 131:535–538.

Ogasawara, K. Bannai, M. Saitou, N. et al. 1996. Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Human Genetics*, 97 : 777-783

Ohashi, J. Naka, I. Kimura, R. et al. 2006. Polymorphisms in the ABO blood group gene in three populations in the New Georgia group of the Solomon Islands. *The Japan Society of Human Genetics*, 51: 407–411.

Peakall, R. and Smouse, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.

R Core Team (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. <http://www.R-project.org/>.

Reynolds, J. Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1983. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.

Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics VII*. University of Texas, 7213: 145-153.

Sanguinetti, C. J. Dias Neto, E. and Simpson A. J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17: 914-921.

Sans, M. 1991. Características genéticas de la población uruguaya en base al sistema HLA y 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. Sosa, M. Alvarez, I. et al. 1993. Blood group frequencies and the question of race admixture in Uruguay. *Interciencia*, 18: 29-32.

Sans, M. Salzano, F.M. Chakraborty, R. 1997. Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Human Biology*, 69: 161-170.

Sans, M. 2009. "Raza", Adscripción Étnica Y Genética En Uruguay. *RUNA*, 2: 163-174.

Wright S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. 4: Variability within among Natural Populations. University Chicago Press, Chicago.

Yamamoto, F. Clausen, H. White, T. et al. 1990. Molecular genetic basis of the histoblood group ABO system. *Nature*, 345: 229-233.

Yip, S P. 2000. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood*, 95: 1487-1492.

Yip, S.P. 2002. Sequence variation at the human ABO locus. *Annals of Human Genetics*, 66: 1-27.

11. Anexos

11.1

Extracción y purificación de ADN en pelo (Hidalgo et al. 2009)

Preparación de las muestras:

Cada cabello fue cortado en segmentos de 3mm, en una longitud de 5 – 10 cm, desechándose el extremo distal. Los fragmentos fueron colocados en un tubo de plástico (tipo Eppendorf) de 1.5ml. A cada muestra se agrega PBS (buffer fosfato 50mM, ph 7.4, 0.9% NaCl) o buffer STE (100mM NaCl + 10mM Tris-Cl, ph 8.0 + 1mM EDTA) 1 ml.

Las muestras se centrifugan a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante. En algunos casos se puede lavar las muestras con etanol para eliminar posibles contaminantes externos.

La extracción de ADN consiste de los siguientes pasos:

1. A las muestras de pelos se le agregan 550 µl de buffer de lisis (50 mM EDTA, 1% (v/v) 2-mercaptoetanol, NaCl 100 mM) + 20 µl de Proteinasa K (20 mg/ml p/v). Agitas las muestras en un Vortex. Colocándose en un baño de agua a 55°C durante toda la noche (> a 12hs). Se recomienda agitar esporádicamente.
2. Si la digestión de los pelos es parcial, se adiciona 20 µl de buffer de lisis y 10 µl de Proteinasa K, agitándose enérgicamente a 55°C por >1 hr, en algunos casos se puede mantener la digestión por 24hs adicionales.
3. A las muestras se le adiciona 5 µl de ARNasa (100 mg/ml) incubándose a temperatura ambiente por 30 minutos. Incubar a 95°C por 10 minutos.
4. Centrifugar a 16×10^3 por 20 minutos a 4°C.
5. Se transfiere 400 µl del sobrenadante a otro tubo y se le adiciona 40 µl de buffer de Acetato de sodio a 3M, ph 2.4. Se le agrega 1.5 µl de glucógeno y luego 1 ml de Etanol 100% a -20°C. Se observa un precipitado.
6. Las muestras se dejan a -20°C durante toda la noche.
7. Las muestras se centrifugan a 16×10^3 por 30 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se le adiciona al precipitado 1ml de Etanol 70% (v/v) a 4°C, agitándose enérgicamente en un Vortex.

8. Se centrifuga a 16×10^3 por 30 minutos a 4°C. Descartándose el sobrenadante.
9. Se resuspende el precipitado en 1ml de Etanol 70% (v/v) a 4°C, agitándose enérgicamente en un Vortex.
10. Las muestras se centrifugan a 16×10^3 por 30 minutos a 4°C y se descarta el sobrenadante.
11. Las muestras se conservan destapadas en la heladera a 4°C durante toda la noche.

Se resuspende el precipitado en 20 µl de buffer TE (EDTA 10mM).

Las muestras se conservan a -20°C.

11.2

Protocolo de extracción de ADN de saliva (Dr. Bernardo Bertoni)

1. Centrifugar 500 ul de saliva a 8000 rpm durante 10 minutos.
2. Descartar sobrenadante.
3. Lavar el pellet con 1 ml de STE (adicionar el STE, vortexear, centrifugar por 5 min y descartar el sobrenadante).
4. Agregar 500 ul de solución de lisis celular para glóbulos blancos + 15 ul de Proteinasa K y resuspender el pellet (con pipeta).
5. Dejar en baño caliente por 1 hora 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 Eppendorf 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 se vea 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 100 ul de agua destilada. Dejarlo overnight a 37° C.

11.3

Cálculo de frecuencias.

Frecuencias genotípicas (calculadas por observación directa):

$$f(0101)=5/50=0,1$$

$$f(0101v)=9/50=0,18$$

$$f(01v01v)=5/50=0,1$$

$$f(01v02)=1/50=0,02$$

$$f(A01)=17/50=0,34$$

$$f(AA)=6/50=0,12$$

$$f(AB)=2/50=0,04$$

$$f(B01)=3/50=0,06$$

$$f(B01v)=2/50=0,04$$

Frecuencias alélicas (calculadas utilizando el modelo de Hardy-Weinberg):

$$f(A)=f(AA)+\frac{1}{2}f(AB)+\frac{1}{2}f(A01)+\frac{1}{2}f(A01v)=6+\frac{1}{2}(2)+\frac{1}{2}(17)+\frac{1}{2}(0)=15,5$$

$$f(B)=f(BB)+\frac{1}{2}f(BA)+\frac{1}{2}f(B01)+\frac{1}{2}f(B01v)=0+\frac{1}{2}(2)+\frac{1}{2}(3)+\frac{1}{2}(2)=3,5$$

$$f(01)=f(0101)+\frac{1}{2}f(A01)+\frac{1}{2}f(B01)+\frac{1}{2}f(0101v)=5+\frac{1}{2}(17)+\frac{1}{2}(3)+\frac{1}{2}(9)=19,5$$

$$f(01v)=(01v01v)+\frac{1}{2}f(0201v)+\frac{1}{2}f(B01v)+\frac{1}{2}f(01v01)=5+\frac{1}{2}(1)+\frac{1}{2}(2)+\frac{1}{2}(9)=11$$

$$f(02)=\frac{1}{2}f(01v02)=\frac{1}{2}(1)=0,5$$

Frecuencias alélicas relativas:

$$f(A)=15,5/50=0,31$$

$$f(B)=3,5/50=0,07$$

$$f(01)=19,5/50=0,39$$

$$f(01v)=11/50=0,22$$

$$f(02)=0,5/50=0,01$$