



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Departamento de Genética

Tesista

Laura A. Glesmann

**Variación de los Genes COMT, MAO-A E IL1RN
en dos provincias argentinas: hacia una terapia
paliativa personalizada**

Tesis presentada para obtener el título de
“Licenciada en Genética”

Directora

Dra. Cecilia I. Catanesi

Co-Directora

Dra. Lidia B. Arbeletche de Vidal Rioja

Posadas, Misiones 2009



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales

**“VARIACION DE LOS GENES COMT, MAO-A E IL1RN
EN DOS PROVINCIAS ARGENTINAS: *HACIA UNA
TERAPIA PALIATIVA PERSONALIZADA*”**

Laura A. Glesmann

Directores:
Dra. Cecilia I. Catanesi
Dra. Lidia B. Arbeletche de Vidal Rioja



Instituto multidisciplinario de biología celular (IMBICE)
Laboratorio de genética molecular

La Plata-Buenos Aires-Argentina

-2009-

Dedicatoria



*A mi Papá y Mamá,
mi hermana Valeria, Fabito y Char.*

Agradecimientos



Agradezco :

- A las autoridades del IMBICE por permitirme concluir mis estudios en el mismo.
- A la Dra. Lidia Vidal Rioja por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio, por su apoyo y por aceptar ser mi codirectora de tesis y directora de beca.
- A Cecilia Catanesi por transmitirme sus conocimientos, por ser mi guía fundamental en este emprendimiento y por ser muchas veces aparte de mi dire, una amiga.
- A mis padres por permitirme desarrollar mi vocación libremente y por apoyarme incondicionalmente.
- A mi hermanita Vale, por estar siempre y por darme ánimos en los momentos difíciles y a Fabito, por entrar a nuestras vidas.
- A Char, por todo, por su cariño, su paciencia, su compañía en estos últimos años de mi carrera, por sus ganas de ayudarme a estudiar aunque no entienda mucho, por transmitirme sus conocimientos, por ayudarme hacer posible esta tesis, por elegir seguir su vida al lado mío.
- A las brujas (Nadia, Lore, Adri, Cristhi) con quienes compartí momentos de alegría, mates, teres, días enteros de estudio, salidas, y me apoyaron en los momentos difíciles, gracias amigas.
- A Marcos, por ayudarme a conseguir todos los papeles que necesitaba y por ser mi compañero de estudio y un gran amigo.
- A los chicos de la Facu con quienes compartí este hermoso camino, Ali, Carol, Pascual y Sil.
- A la familia de Char, por abrirme la puerta de su casa, y aceptarme en su familia.
- A las chicas de “filosofía molecular”: Flor, Miri, Romi, gracias, por sus consejos de trabajo de laboratorio y de la vida en general, por las charlas con mate, risas y por alentarme en esta carrera.
- A Cesar, por sus grandes conocimientos. A Silvina Richardt y Graciela Baillet, por sus consejos que me fueron de mucha ayuda y a Jorge López-Camelo por su ayuda en estadística.
- A mis compañeros del IMBICE, en quienes descubrí un maravilloso grupo humano.
- A Mariela, Pablo, Adri, Marcos, Lupe, Miri, Julieta, Julia, y a mi mamá por ayudarme en la recolección de muestras.
- A CIC provincia de Buenos Aires por otorgarme la beca.
- A los donantes de las muestras biológicas para la realización de este trabajo.
- A toda mi familia (Tios, primos, a mis abuelas).
- A los profesores de la facultad por su gran dedicación y su compromiso hacia nosotros.
- A Ceci Neu, por esta amistad de tantos años.
- A los chicos de Monte, Kari, Queco, Rodri, Moni, mi prima Ilse por todo lo vivido.
- Gracias a todos!!!



	<i>Páginas</i>
DEDICATORIAS	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
FACTORES BIOLÓGICOS QUE AFECTAN LA SENSIBILIDAD Y TOLERANCIA DEL DOLOR.....	9
GENÉTICA DE POBLACIONES.....	9
FRECUENCIAS GENICAS Y EQUILIBRIO DE HARDY WEINBERG.....	1
0	
EVOLUCION DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS.....	11
POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	13
POBLACION ARGENTINA.....	15
POBLACION BONAERENSE.....	16
POBLACION MISIONERA.....	17
GENES ANALIZADOS.....	18
COMT= GEN DOPAMINERGICO CATECOL-O-METIL TRANSFERAS.....	18
MAO= MONOAMINO OXIDASA.....	19
IL1-RN= ANTAGONISTA ENDOGENO DEL RECEPTOR IL-1.....	21
HIPOTESIS	22
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
POBLACIONES ANALIZADAS.....	24
EXTRACCION DE ADN.....	25
MARCADORES ANALIZADOS.....	26
AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR.....	27
REACCIONES DE PCR.....	28
DIGESTION ENZIMATICA.....	31
ELECTROFORESIS:.....	31
GELES DE POLIACRILAMIDA.....	32
TINCION DEL GEL.....	33
GELES DE AGAROSA.....	33
CALCULOS ESTADÍSTICOS.....	34
FRECUENCIAS ALELICAS Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS.....	34
FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS.....	34

ESTRUCTURA					
	POBLACIONAL.....				
35				
EQUILIBRIO					
	HARDY-WEINBERG.....				
35				
CALCULOS	DE	LA	VARIABILIDAD		
	POBLACIONAL.....				35
NÚMERO		DE		ALELOS	
				
	..35				
HETEROCIGOSIS OBSERVADA.....					36
HETEROCIGOSIS					
	MEDIA:.....				
36				
HETEROCIGOSIS	ESPERADA	O	DIVERSIDAD	GÉNICA	
	POBLACIONAL.....				37
COMPARACIÓN	DE	LA	VARIACIÓN	ENTRE	LAS
	POBLACIONES.....				37
INDICE		DE		WRIGTH	
	Fst.....				
37				
ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR = AMOVA.....					38
RESULTADOS.....					39
POLIMORFISMOS DEL GEN COMT: RS4680 Y RS4818.....					39
POLIMORFISMO DEL GEN MAO-A: VNTR-MAO-A.....					43
POLIMORFISMO DEL GEN IL1RN: VNTR-IL1RN.....					46
ANÁLISIS DE LOCI COMBINADOS.....					48
DISCUSIÓN.....					50
CONCLUSIONES.....					56
PERSPECTIVAS.....					57
BIBLIOGRAFÍA.....					58
REFERENCIAS ELECTRONICAS.....					67

Resumen



Las variaciones en el componente genético contribuyen de una manera significativa a la sensibilidad al dolor. Por lo tanto es importante el estudio de la susceptibilidad genética al dolor, dada la gran variabilidad interindividual en la sensibilidad a estímulos nocivos diarios, en la capacidad para desarrollar síndromes de dolor crónico y en las respuestas a los tratamientos analgésicos. Es de particular interés conocer las variantes genéticas que presenta una población de una región geográfica determinada, para facilitar el punto de partida para estudios posteriores de ligamiento y de asociación. Para ello en este trabajo apuntamos a conocer e identificar variantes de los genes COMT, MAO-A e IL1RN, que están involucrados en la vía de la sensibilidad al dolor.

En este trabajo se analizó la variación de cuatro marcadores: dos VNTRs, MAO-A e IL1RN, y dos SNPs, rs4680 y rs4818 en la población bonaerense y misionera, a partir de sus frecuencias alélicas y genotípicas. Además se comparó la variabilidad de estos polimorfismos entre ambas poblaciones, y se buscaron diferencias con otras poblaciones del mundo descritas en la bibliografía.

El material de estudio consistió en ADN aislado a partir de muestras de hisopado bucal o sangre periférica. Mediante amplificación por PCR y electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa, se obtuvo para cada individuo analizado su constitución genotípica.

Los cuatro marcadores resultaron polimórficos tanto en la provincia de Misiones como en la de Buenos Aires. La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas

mostraron resultados similares para ambas poblaciones en los cuatro marcadores analizados. La mayor cantidad de variación se observó dentro de cada población.

No se hallaron diferencias marcadas en relación con los datos bibliográficos para otras poblaciones del mundo, principalmente comparadas con las poblaciones europeas, por lo cual se concluye que la contribución de comunidades amerindias locales no ha tenido un efecto importante en las frecuencias alélicas de estos marcadores.

Estos resultados podrán contribuir a la conformación de una base de datos para su utilización en terapias paliativas futuras.

Introducción



***"el dolor trastorna y destruye la naturaleza
de la persona que lo siente".***

La definición de dolor más utilizada como referencia es la expresada por la Asociación Mundial para el Estudio del Dolor (IASP): “Es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño”.

El dolor puede definirse también como una experiencia que todo ser vivo trata de evitar y una alarma que nos ayuda a huir y alejarnos de la noxa provocadora de dolor (Jornada PROMEDOLOR, 2008; Bataille, 1997). Es una sensación difícil de definir debido a la multiplicidad de fenómenos con los que puede estar relacionado: experiencias físicas, factores biológicos, psicológicos y sociales del individuo (Mogil, 1999), los cuales pueden condicionar la sensación dolorosa; la consecuencia del estado de dolor en mayor o menor grado influye en la posibilidad del individuo de desarrollar sus actividades de manera normal, y en ello radica la importancia del estudio del mismo.

Muchas veces la persona no posee un daño tisular, pero percibe dolor, por lo tanto el dolor deber ser considerado como una experiencia altamente subjetiva y con un componente individual (Armero *et al.*, 2004).

Existen varias estrategias a la hora de clasificar el dolor, debido a que se puede diferenciar según su etiología, la expectativa de vida del paciente, la región afectada, la intensidad y el tiempo de duración del dolor entre otras (López Timoneda, 1996).

Clásicamente se han distinguido tres tipos de dolor: el dolor agudo, el dolor fisiológico y el dolor crónico, que se diferencian principalmente en el tiempo de evolución. Por otra parte, según su origen, se puede dividir al dolor en somático (nociceptivo) y neuropático (Armero *et al.*, 2004). Estas dificultades para la caracterización y clasificación del dolor están relacionadas con su complejidad, la cual involucra a varias áreas de investigación.

En la percepción de la sensación dolorosa participan el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP). El dolor desencadena una serie de reacciones en ambos sistemas que permite la percepción del mismo, con la finalidad de disminuir la causa y limitar las consecuencias. Primero se produce la activación y sensibilización de los nociceptores periféricos; luego los mensajes nociceptivos son transmitidos, modulados, e integrados en diferentes niveles del sistema nervioso que van desde la periferia por vía medular hasta los centros superiores (tálamo, Córtex). Estas vías por las cuales se transmite el mensaje doloroso están señalizadas por proteínas específicas, las cuales son codificadas por diferentes genes.

FACTORES BIOLÓGICOS QUE AFECTAN LA SENSIBILIDAD Y TOLERANCIA DEL DOLOR

En los últimos años se ha observado que existen diferencias en la sensibilidad y la tolerancia a la sensación dolorosa, como así también diferentes respuestas a los fármacos analgésicos en los individuos (Armero *et al.*, 2004).

Se ha demostrado en varias investigaciones que existen diferencias étnicas en la clínica del dolor (Rahim-Williams *et al.*, 2007), según estudios que mostraron diferencias en la sensibilidad y tolerancia al dolor en la comparación entre individuos

norteamericanos de origen africano y de origen europeo (denominados en la bibliografía como “afro americanos” y “blancos”). Riley *et al.* (2002) han estudiado el dolor crónico, reportando que los “afro americanos” presentan mayores niveles de sensibilidad al dolor que los “blancos”. También se ha demostrado que pacientes “afro americanos” presentaban mayores niveles de dolor en comparación con los “blancos” en condiciones clínicas como glaucoma (Sherwood *et al.*, 1998), SIDA (Breitbart *et al.*, 1996), migraña (Stewart *et al.*, 1996), dolor postoperatorio (Faucett *et al.*, 1994; White *et al.*, 1999) y dolor no específico (Edwards and Fillingim, 1999). Otro trabajo sobre tolerancia al dolor demostró que los “afro americanos” poseen una menor tolerancia al mismo debido a alteraciones en los mecanismos endógenos reguladores del dolor (Mechlin *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que las variaciones en el componente genético contribuyen de una manera significativa a la sensibilidad al dolor. Por lo tanto es importante el estudio de la susceptibilidad genética al dolor, dada la gran variabilidad interindividual en la sensibilidad a estímulos nocivos diarios, en la capacidad para desarrollar síndromes de dolor crónico y en las respuestas a los tratamientos analgésicos (Mogil, 1999, 2004).

Los estudios genéticos asociados a la sensibilidad al dolor en humanos incluyen principalmente dos tipos:

A) **Estudios de ligamiento:** se analizan patrones de herencia de cada uno de los genes candidatos. Se requiere un fenotipo definido y familias con muchos integrantes, por Ej. Estudios de pacientes con migrañas.

B) **Estudios de asociación:** se comparan frecuencias alélicas de genes candidatos en poblaciones con diferentes fenotipos; estos estudios se realizan analizando variaciones genéticas que se encuentran tanto en regiones codificantes como no codificantes (Armero *et al.*, 2004).

Al margen de estas estrategias de análisis, es de gran importancia conocer las variantes genéticas que presenta una población de una región geográfica particular, facilitando así un punto de partida en los estudios de ligamiento y de asociación. Este trabajo apunta a conocer esta variación.

GENETICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones se encarga de estudiar el comportamiento de los genes en la población mendeliana (Cook, 1979). Ésta última se define como una población de individuos que pueden cruzarse entre sí, compartiendo el mismo número de genes, los cuales se transmiten de generación en generación según las leyes de Mendel. Según el equilibrio Hardy-Weinberg una población infinitamente grande permanece invariable, sin ser afectada por las fuerzas como selección diferencial, mutación y migración. Pero las poblaciones naturales sí están influenciadas por estas fuerzas, sufriendo cambios en su composición genética (Cavalli Sforza, 1981).

FRECUENCIAS GENICAS Y EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

Las diferentes variantes de un gen, llamadas alelos, difieren como resultado de variaciones de tamaño o de secuencia y pueden aparecer con frecuencias diferentes en las distintas poblaciones de una especie (Lewin, 1997).

La frecuencia alélica o génica, es la frecuencia de un determinado alelo en la población, como fracción de todos los alelos posibles de un locus determinado (Cook, 1979). Es igual a la frecuencia de los homocigotos para el alelo considerado más la mitad de la frecuencia de los heterocigotos que portan dicho alelo.

Como el genoma humano está compuesto por 23 pares de cromosomas (individuos diploides), los genes localizados en ellos también se presentan en doble dosis. Como excepción a esto, los genes ubicados en la región específica de los cromosomas sexuales X e Y, como también la información ubicada en el ADN mitocondrial se encuentran en una sola dosis, es decir que los individuos son hemocigotas para estos genes.

Las frecuencias genotípicas están determinadas principalmente por las frecuencias de los genes en la población y denotan la proporción de los distintos genotipos presentes en la misma. Por lo tanto para la descripción de la evolución en una población es conveniente considerar los cambios en las frecuencias alélicas o génicas (Cavalli Sforza, 1981).

El teorema de Hardy- Weinberg postulado en 1908 por G. H. Hardy y W. Weinberg, formula que cuando una población tiene un tamaño muy grande y los apareamientos ocurren al azar, y en ausencia de procesos de mutación, selección y migración, la población mantiene la variación genética a su nivel inicial (Strickberger 1976, Cook 1979, Cavalli Sforza, 1981). De esta manera, las frecuencias alélicas y genotípicas de un locus dado se mantienen constantes de una generación a otra; esto es equivalente a decir que se mantienen en equilibrio.

El modelo de Hardy-Weinberg explica que en una población bajo estas condiciones, para un locus simple que tenga dos alelos A y a, donde todas las gametas sean viables, las frecuencias genotípicas siguen la ecuación:

$$p^2+2pq+q^2$$

$$p+q=1 \text{ donde } p \text{ representa al alelo A y } q \text{ al alelo a.}$$

A partir del teorema de Hardy-Weinberg podemos expresar las distribuciones genotípicas en una o varias poblaciones que se encuentren en equilibrio en términos de sus frecuencias alélicas y genotípicas (Cavalli Sforza, 1981). De este modo, los cambios en las frecuencias alélicas reflejan el proceso de evolución en una población (Wright, 1969).

EVOLUCION DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS

Las frecuencias alélicas o génicas de una población cambian con el tiempo debido a la acción de fuerzas que dirigen la evolución; estas fuerzas son: las migraciones, la deriva genética, la selección natural y las mutaciones.

La migración consiste en el intercambio de individuos entre poblaciones, este intercambio puede retrasar el proceso de diferenciación entre las poblaciones

ocasionado por la deriva genética, y el efecto amortiguador depende de la cantidad de individuos que migran (Cavalli Sforza, 1981).

Las migraciones pueden ser causadas por: causas biológicas, naturales o culturales. El cambio que se producirá en una población a causa de la migración va a depender tanto del número de inmigrantes como del tamaño de la población receptora. Los movimientos migratorios pueden realizarse de forma brusca y rápida (invasiones) o bien llevarse a cabo lenta y difusivamente (infiltración) (Valls, 1985).

La deriva genética consiste en la fluctuación al azar de las frecuencias alélicas y es el resultado de la acumulación de fluctuaciones aleatorias debidas al muestreo gamético, para formar la siguiente generación (Cavalli Sforza, 1981). El paso de alelos se da a través de las gametas que están sujetas a un sesgo que dependerá del número de progenitores contribuyentes a la formación de la generación siguiente. Una población pequeña sufrirá grandes fluctuaciones en la mayoría de sus genes, mientras que una grande estará sometida a una menor fluctuación, resultando en un efecto menor de la deriva genética.

La selección natural es una fuerza que permite la adaptación, y por lo tanto la supervivencia de individuos a un ambiente determinado. Se produce a partir de determinadas condiciones de un medio ambiente que favorece o dificulta - es decir, selecciona - la reproducción de cada organismo de la población según sean sus peculiaridades, y por ello es la única fuerza evolutiva que tiene una consecuencia adaptativa directa.

Las mutaciones se producen al azar, y su destino depende de su efecto en el individuo portador. Por medio del proceso selectivo, se favorecen los individuos con mutaciones útiles, reproduciéndose de forma diferencial y dejando mayor descendencia, en cambio se eliminan los que poseen mutaciones desfavorables. Además, existen mutaciones en el ADN que no producen cambios en el fenotipo, son las denominadas silenciosas y neutras, ya que no afectan a la supervivencia del individuo, y por ello escapan de la selección natural; sólo actuaría sobre ellas la deriva genética (Kimura 1985; Bittles and Neel, 1994; Lewin, 2001).

Un gen mutante puede ser favorecido por selección (o por deriva génica) pudiendo de esta forma incrementar su frecuencia en la población (Cavalli Sforza, 1981). Sin las mutaciones, la evolución muy pronto se detendría. Pero el destino de las

mutaciones ocurridas depende de las otras fuerzas evolutivas, las cuales pueden afectar la frecuencia alélica de un alelo presente en una población (Cavalli-Sforza *et al.*, 1996).

POLIMORFISMOS GENETICOS

Se define como polimorfismo genético a la coexistencia de múltiples alelos en un locus (Lewin, 2001). El polimorfismo afecta tanto a regiones codificantes del genoma como regiones no codificantes. La distinción entre mutación y polimorfismo no suele ser clara. Comúnmente se asocia a la mutación con situaciones excepcionales, patológicas, en cambio cuando hablamos de polimorfismo, nos referimos a las variaciones genéticas comunes, estables y nada o poco perjudiciales en la población (Luque Cabrera, 2002). En sentido estricto, una región es llamada polimórfica si la variante más frecuente está presente en la población con una frecuencia menor o igual al 99% (Lewin, 2001).

Los polimorfismos genéticos pueden estudiarse por medio de técnicas moleculares estableciéndose marcadores genéticos, los cuales corresponden a un gen, una región de un gen, o una región no génica.

La gran gama de marcadores genéticos incluye:

1- La longitud de los fragmentos de restricción: o RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), los cuales son secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción y varían entre los individuos.

2- Polimorfismos con repeticiones en tándem: estos incluyen los VNTR (*variable number of tandem repeats*), también llamados minisatélites, que generalmente se dan en secuencias de ADN no codificante, y poseen repeticiones de entre 10 y 200pb. El polimorfismo reside en el distinto número de unidades de repetición que presenta un individuo, y los alelos se nombran de acuerdo con la cantidad de repeticiones que llevan. Entre estos polimorfismos también se incluyen los microsatélites o STRs (*short tandem repeats*), con repeticiones en tándem muy cortas, entre 2 y 8 pb, donde el polimorfismo también está dado por la cantidad de unidades repetidas que se presentan en el locus (Luque Cabrera, 2002).

3- También existen regiones variables en el genoma en las cuales se da una variación en la secuencia del ADN que afecta a una sola base. Son los llamados polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*single nucleotide polymorphism*). Algunos autores incluso consideran que los cambios de unos pocos nucleótidos, como también pequeñas inserciones y deleciones pueden ser consideradas como SNP (Gibson and Muse, 2004), pero estos polimorfismos son más generalmente denominados In/Dels (*insertion/deletions*). Los SNP que se localizan dentro de una secuencia codificante, pueden ser sinónimos si no modifican la secuencia de aminoácidos, y no-sinónimos cuando modifican la secuencia aminoacídica (Luque Cabrera, 2002).

Los polimorfismos pueden ubicarse tanto en cromosomas autosómicos como sexuales (X e Y) pero estos últimos tienen un comportamiento diferente en la heredabilidad de sus genes. Los cromosomas sexuales divergieron a partir de simples cromosomas autosómicos hace unos 300 millones de años y estuvieron sometidos a un posterior proceso de diferenciación (Lahn and Page, 1999).

El cromosoma X se presenta en doble copia en la mujer (sexo homogamético), y en una sola dosis en el hombre (sexo heterogamético), por ello si un gen o una región no génica se encuentra sólo en el cromosoma X, el individuo varón sólo presentará un alelo, heredado de su madre; en cambio si es mujer, el locus en cuestión se comportará como si fuera autosómico.

Los marcadores del X en los varones generan un haplotipo, que es una asociación de los alelos observados para dos o más marcadores de ADN en un sistema que no recombina. Esta característica la comparte con el genoma mitocondrial y con el cromosoma Y (Lewin, 2008).

POBLACION ARGENTINA

Argentina es un país que ha recibido varias oleadas migratorias, desde diferentes partes del mundo. En la etapa precolombina Argentina aún poseía su población aborigen, pero con el correr de los años esto fue cambiando rápidamente con las invasiones españolas y la llegada de inmigrantes a diferentes puntos del país.

Oleadas inmigratorias: En el período colonial ocurrieron dos acontecimientos importantes, el primero de ellos entre los siglos XVI a XVIII, fue la llamada conquista española, durante la cual llegaron al país principalmente hombres

españoles; también en esta época se produjo en otros sectores del continente la colonización portuguesa.

El segundo acontecimiento se produjo entre los siglos XVII y XVIII con la entrada forzada al país de esclavos africanos. En la etapa colonial se produjeron mestizajes entre españoles, portugueses, africanos e indígenas, pero los africanos fueron drásticamente reducidos en la población argentina debido, en parte, a que fueron utilizados como “carne de cañón” en las guerras civiles (Avena *et al*, 2006), y también afectados por las epidemias. Entre los años 1850 y 1950 nuestro país recibió una cantidad considerable de inmigrantes de diferentes partes del mundo, pero principalmente europeos. Casi la mitad de estos inmigrantes fueron italianos (45%) en tanto que los españoles fueron un tercio. Hubo también contribuciones significativas de franceses (3,6%), polacos (2,7%), rusos (2,7%), turcos (2,6%), alemanes (2,3%), judíos (1-2%), ucranianos, británicos (1,1%), portugueses (1%), yugoslavos (0,7%), suizos (0,7%), griegos, irlandeses, galeses, holandeses (0,2%), belgas (0,4%), croatas, checos, daneses (0,3%), estadounidenses (0,2%) y suecos (0,1%) (<http://www.mininterior.gov.ar/migraciones/museo/index.html>). También hubo un número considerable de inmigrantes de países no-europeos, principalmente provenientes de Siria, El Líbano, Armenia (<http://www.mininterior.gov.ar/migraciones/museo/index.html>). Ya a mediados del siglo XX empezaron a darse migraciones internas y latinoamericanas de países fronterizos y Perú, introduciendo el componente indígena. De esta manera se está reduciendo lenta pero sostenidamente el porcentaje del componente europeo en la composición étnica de la población. (Avena, 2006). Pero debido a la magnitud del aporte europeo el mismo continuará siendo predominante.

En menor medida encontramos a comunidades árabes (integradas principalmente por descendientes de sirio-libaneses) (http://es.wikipedia.org/wiki/Composici%C3%B3n_%C3%A9tnica_de_Argentina), judías (que es la tercera más importante en el continente), armenias, japonesas, chinas (llegados a nuestro país en la década del '70), surcoreanas y laosianas, estas últimas dos comunidades empezaron a llegar al país en la década del '90. La comunidad japonesa se encuentra en nuestro país desde 1920 aproximadamente. En general las comunidades

asiáticas son las que participan en menor medida en el mestizaje de la población, especialmente la japonesa.

POBLACION BONAERENSE

Se encuentra formada principalmente por descendientes de comunidades europeas, y la contribución más importante fue de las comunidades española e italiana llegada principalmente durante la gran ola de inmigración europea (1850-1950).

También encontramos en menor medida colonias y comunidades de franceses, alemanes, polacos, judíos, árabes, coreanos, chinos, vietnamitas y japoneses, paraguayos, bolivianos y uruguayos (http://es.wikipedia.org/wiki/Composici%C3%B3n_%C3%A9tnica_de_Argentina, <http://www.pagina12.com.ar/2001/suple/No/01-07/01-07-05/NOTA1.HTM>). Las últimas tres comunidades mencionadas han crecido en los últimos años: según el censo del 2001, la comunidad paraguaya cuenta con unos 325.000 habitantes en el Gran Buenos Aires mientras que la comunidad boliviana, la segunda en cantidad de extranjeros, cuenta con 233.000 individuos distribuidos en las grandes ciudades del país. La comunidad uruguaya ocupa la sexta posición en cantidad de individuos contando con 118.000 inmigrantes, la mayoría residiendo en Buenos Aires.

Una oleada inmigratoria relativamente reciente en el país pero que está creciendo aceleradamente, es la comunidad peruana que habita en la ciudad de Buenos Aires. Por último, la comunidad brasilera es muy pequeña, alcanza 35.000 inmigrantes y la gran mayoría se encuentran en Buenos Aires. Existen también otras comunidades latinoamericanas pequeñas, entre las que se destacan los ecuatorianos, colombianos y cubanos.

POBLACION MISIONERA

La provincia de misiones hasta la llegada de los españoles estuvo poblada en su gran mayoría por nativos guaraníes (http://www.misionesvive.com.ar/historia_misiones.html) pero al igual que otras provincias de la argentina, ha sufrido oleadas inmigratorias; las dos corrientes principales fueron: la colonización oficial, principalmente al sur de la provincia

(Apóstoles, Concepción de la Sierra, Santa Ana, San Ignacio), los inmigrantes provenían del imperio austro-húngaro, eran polacos y ucranianos.

La segunda oleada inmigratoria se denominó “colonización privada” y estuvo formada por inmigrantes predominantemente alemanes, los cuales llegaron a la provincia luego de la primera guerra mundial, se ubicaron y fundaron las ciudades de El dorado, Montecarlo, Puerto Rico y San Alberto; también se produjo una colonización privada espontánea o secundaria, realizada por familiares y amigos de colonos ya asentados en la provincia; estos nuevos inmigrantes se situaron en la zona de las sierras centrales, originando las ciudades de Oberá, Aristóbulo del Valle, Campo Viera, Campo Grande, Dos de mayo, San Vicente y Leandro N. Alem. También Misiones recibió inmigrantes, pero en menor cantidad de Rusia, Austria, Finlandia, Noruega, Italia, Dinamarca, Suecia, Paraguay, Suiza, Brasil, El Líbano, Francia, Inglaterra, España y Siria.

Luego de la segunda guerra mundial, llegaron a la provincia inmigrantes japoneses a las zonas de Garuhapé, Jardín América y Oasis. Y en los últimos años llegaron inmigrantes provenientes de Laos, Corea del Sur y de Taiwán (<http://www.misiones.gov.ar/historia/HistoriaContemporanea.htm>).

GENES ANALIZADOS

COMT= GEN DOPAMINERGICO CATECOL-O-METIL TRANSFERASA

Se ubica en el brazo largo del cromosoma 22, en la posición 22q11.21-q11.23, y codifica la enzima catecol-o-metil transferasa (Figura 1). Esta enzima es importante para el mantenimiento de la homeostasis regulando la degradación

de neurotransmisores como las catecolaminas (dopamina, norepinefrina y noradrenalina). Actúa catalizando la transferencia de un grupo metilo de la coenzima S-adenosil-metionina (SAM) a uno de los grupos hidroxilo de las catecolaminas en presencia de magnesio para degradarlas, y su mayor actividad se da en la corteza frontal del cerebro. Su participación en la reducción de la dopamina liberada es una de las más importantes en los mamíferos (Nackley *et al.*, 2006; Huerta *et al.*, 2007).

En este gen encontramos un polimorfismo de gran interés biomédico que afecta a la capacidad de degradar o inactivar las catecolaminas, es un polimorfismo de punto (rs4680), con dos alelos, guanina (G) y adenina (A) que generan un cambio de un aminoácido en la proteína COMT. Cuando tenemos guanina, se presenta en la proteína el aminoácido valina, y cuando tenemos adenina, se produce el cambio de la valina por una metionina en el codón 108 (forma soluble de COMT) o en el codón 158 (forma unida a la membrana de COMT), denominándose Val108/158Met. Con estos dos alelos se generan tres genotipos posibles: Val/Val (actividad alta de la enzima), Val/Met (actividad media, debido a que los alelos Met y Val son codominantes) y Met/Met (actividad baja), por lo tanto el genotipo Va/Val produce un mayor catabolismo de los neurotransmisores y, en su contraparte, el genotipo Met/Met se relaciona con un menor catabolismo. Esto puede asociarse con diferentes condiciones y características neuropsiquiátricas, incluyendo el grado de sensibilidad al dolor. En consecuencia, los individuos que portan la sustitución tendrán una mayor actividad de neurotransmisión dopaminérgica, resultando en un menor nivel de encefalinas y una disminución de la producción de opioides endógenos (Zubieta *et al.*, 2003; Huerta *et al.*, 2007).

También existen otros polimorfismos en el gen COMT: SNPs rs6269, rs4633 y rs4818 que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el SNP Val108/158Met, formando así haplotipos, y aumentando de esta manera la variabilidad del gen (Diatchenko *et al.*, 2005; Vargas-Alarcón *et al.*, 2007). En este trabajo se analizaron el

SNP rs4680 y el rs4818. En este último se produce un cambio de citosina por guanina, pero no se produce un cambio aminoacídico (Leu136Leu).

Este gen es importante en la neuropsiquiatría debido a su participación en el sistema dopaminérgico, pero el mismo no actúa solo sino en conjunto con otros neurogenes y con factores medioambientales.

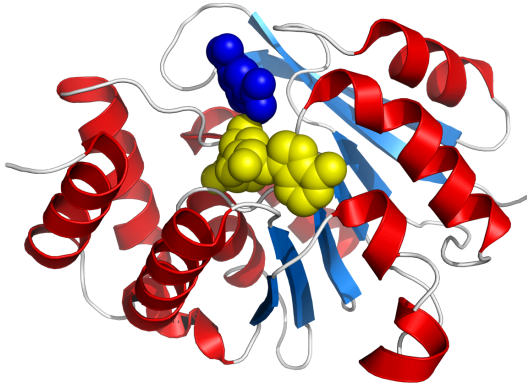


Figura 1: proteína Catecolaminatransferasa humana.

Tomado de <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

MAO= MONOAMINO OXIDASA

Las monoamino oxidasas A y B (MAO-A/B) son enzimas localizadas en la membrana mitocondrial externa, pero codificadas en el genoma nuclear a nivel del cromosoma X. Se encuentran ubicadas en el brazo corto de este cromosoma, en la posición Xp11.23 y Xp11.24 y están presentes en la mayoría de los tipos celulares (Chen *et al.*, 1991, Sabol *et al.*, 1998). Son flavoproteínas que catalizan la desaminación de varias monoaminas como los neurotransmisores y también de algunas aminas exógenas.

La MAO-A es nuestra enzima de interés (Figura 2), la misma es expresada en altos niveles en neuronas catecolaminérgicas (Fowler *et al.*, 1987; Thorpe *et al.*, 1987) desaminando a los neurotransmisores serotonina, norepinefrina (noradrenalina),

epinefrina (adrenalina) y a la dopamina (Erdal *et al.*, 2003). De esta manera los inactiva utilizando el oxígeno para eliminar un grupo amino del neurotransmisor, resultando el correspondiente aldehído y amonio; por ello, también se presume que puedan influir en la sensibilidad al dolor (Metzler, 1989).

En el gen MAO-A se encontraron varios polimorfismos, como el VNTR en el primer intrón (Hinds *et al.*, 1992), una repetición dinucleotídica en el segundo intrón (Konradi *et al.*, 1992), una sustitución de G por T en la posición 1700 y una sustitución de T por C en la posición 1460 (Brunner *et al.*, 1993), sin embargo ninguno de estos parece afectar a la actividad o niveles de expresión de MAO-A (Sabol *et al.*, 1998). No obstante se ha encontrado un VNTR en el promotor que influye en la transcripción del mismo, este VNTR se encuentra localizado 1,2Kb aguas arriba de la secuencia codificante del gen y consiste en una secuencia de 30pb de longitud presente en 2, 3, 3.6, 4 o 5 repeticiones (Sabol *et al.*, 1998). Los alelos con 3 repeticiones contribuyen a una baja actividad de la enzima, mientras que los alelos con 3.6, 4 y 5 repeticiones presentan una alta actividad (Erdal *et al.*, 2003).

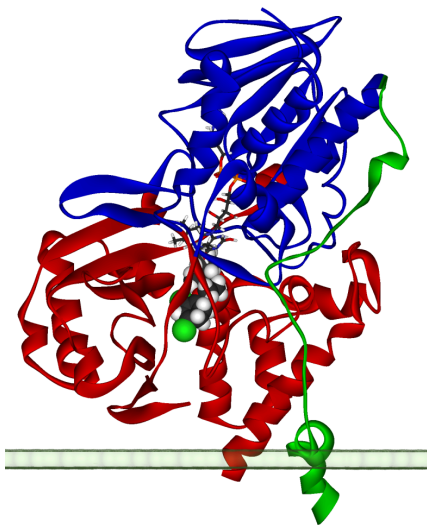


Figura 2: monómero de MAO-A humana insertada en la membrana externa de la mitocondria. Tomado de <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

IL1RN= ANTAGONISTA ENDOGENO DEL RECEPTOR IL-1

La interleuquina 1 (IL-1) pertenece a una superfamilia de citoquinas que lleva su nombre (Vélez-Castrillon *et al.*, 2004), está implicada en varios procesos como la inmunorregulación, inflamación, neurodegeneración y neuroregeneración (Licinio *et al.*, 1999). Se han encontrado 10 moléculas ligandos del receptor de IL-1, tres con funciones agonistas (IL-1alfa, IL-1beta, e IL-18) y un antagonista, IL-1RN, el cual se une al receptor de IL-1 inactivándola e impidiendo la transcripción del mismo. Este antagonista inhibe así los efectos mediados por esta citoquina, la cual aumenta durante los procesos inflamatorios (Vélez-Castrillon *et al.*, 2004).

El gen de este antagonista denominado IL1-RN se encuentra en el cromosoma 2, en la posición 2q13-q14.2. En el intrón 2 del gen se encuentra un VNTR polimórfico, formado por una secuencia de 86pb de longitud (Tarlow *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2007) que se repite 2, 3, 4, 5 o 6 veces (Lee *et al.*, 2004; Witkin *et al.*, 2002). El alelo que presenta 2 repeticiones ha sido asociado con una disminución en la función del receptor IL1-Ra (Santilla *et al.*, 1998) y se ha asociado con procesos inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes y dolor. Además, se ha descrito que los individuos con el alelo 2 en homocigosis padecen de lupus eritomaso (Huang *et al.*, 2002) síndrome de Sjörgren (Perrier *et al.*, 1998) y psoriasis (Coork *et al.*, 1997) con una frecuencia mucho mayor que los individuos que no portan dicho alelo.



HIPOTESIS

El presente análisis fue realizado bajo el supuesto de que existen diferencias en la composición genética de las poblaciones bonaerense y misionera, considerando esta última con un índice migratorio menor, a diferencia de la bonaerense que sufre un proceso de flujo génico mucho más elevado.

Asimismo, se espera encontrar frecuencias alélicas distintas de las europeas para algunos marcadores a causa de la posible influencia de comunidades autóctonas locales, principalmente en la provincia de Misiones, mientras que en la provincia de Buenos Aires, la tasa creciente de inmigrantes de países limítrofes hace esperar también un cambio en las frecuencias alélicas con respecto a las comunidades de origen europeo.

Objetivos



OBJETIVO GENERAL

Identificar variantes de los genes COMT, MAO-A e IL1RN presentes en la población argentina, para su aplicación futura en terapias paliativas.

OBJETIVOS PARCIALES

- Tipificar polimorfismos de los genes COMT, MAO-A e IL1RN en una muestra numéricamente significativa de la provincia de Buenos Aires para estimar las frecuencias de las diferentes variantes alélicas en esta provincia.
- Tipificar los mismos polimorfismos en una muestra de Misiones para estimar las correspondientes frecuencias alélicas.
- Comparar la variabilidad de estos polimorfismos entre las dos poblaciones estudiadas y entre éstas y otras poblaciones del mundo descritas en la bibliografía.



POBLACIONES ANALIZADAS

En este trabajo analizamos muestras de ADN pertenecientes a individuos provenientes de las provincias de Misiones y Buenos Aires, particularmente de las localidades de Montecarlo, Leandro N. Alem, Posadas y Apóstoles para Misiones y, para Buenos Aires, las localidades de La Plata, Vicente López y San Fernando, además de un grupo de muestras del Hospital Rivadavia provistas por el Dr. Jorge Schiaffi de la Sección de ginecología del hospital. Las muestras provienen de individuos argentinos que no se autodenominan como amerindios, con al menos dos de sus abuelos provenientes de Europa. Las muestras provenientes del hospital consistieron en 3 ml de sangre periférica, mientras que todas las demás muestras fueron hisopados bucales.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Rivadavia, y tanto las muestras hospitalarias como los hisopados fueron cedidos bajo consentimiento informado.

En la tabla 1 se detallan el número de individuos estudiados y su procedencia geográfica.

Provincia	Número de individuos
Misiones	81
Buenos Aires	125
Total	206

Tabla 1. Procedencia y tamaños muestrales.

EXTRACCION DE ADN

En la figura 3 se resume el modelo experimental seguido luego de la obtención de las muestras de material biológico.

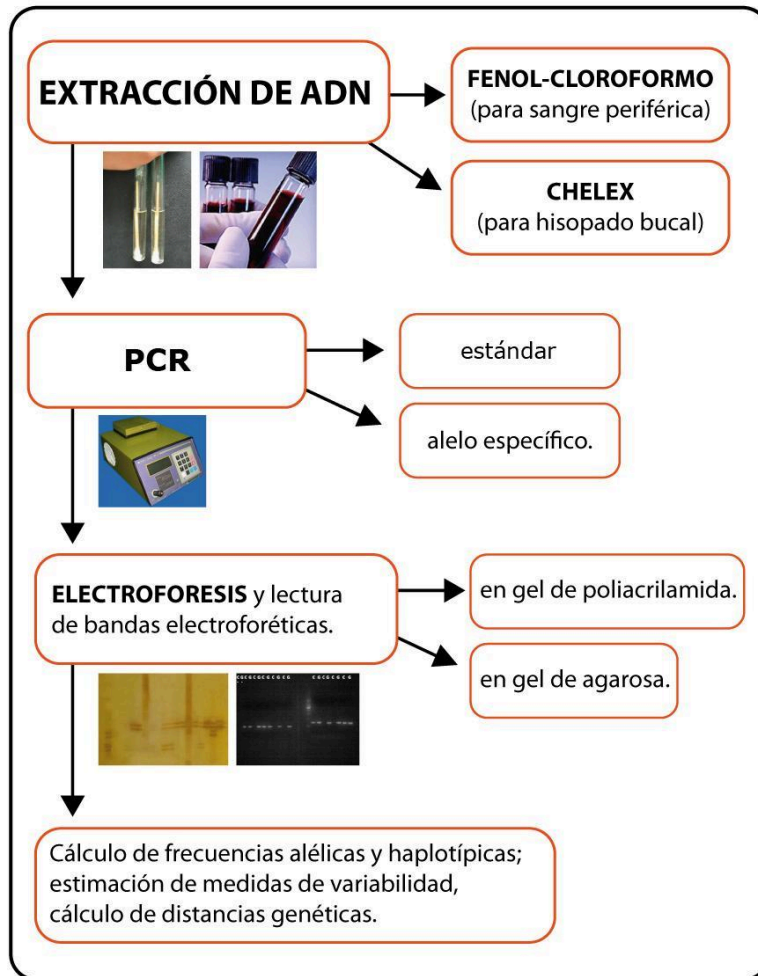


Figura 3. Diagrama de flujo del modelo experimental.

Para las extracciones de ADN a partir de hisopado bucal se utilizó la técnica de Chelex 100[®] (Walsh *et al.* 1991) (BIO-RAD Laboratories, CA, USA). La misma consiste en suspender el hisopo en 1ml de agua destilada MQ[®] (Millipore, Bedford, USA) estéril o PBS, agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se retira el hisopo, se centrifuga 10 minutos a 10000 r.p.m, y se elimina el sobrenadante; se agregan 200 µl de la resina Chelex al 5% al pellet, y se incuba 1 hora a 56°C, y luego 8 minutos a 98°C. Las muestras se almacenan a -20°C hasta su utilización.

Para las muestras de sangre periférica a partir de 3 ml de sangre fresca con 3,5 ml de anticoagulante glucosa citrato se efectuó una extracción orgánica del ADN, utilizando fenol y cloroformo (Sambrook *et al.* 1989).

MARCADORES ANALIZADOS

Se analizaron dos marcadores minisatélites o VNTR:

- **MAOA-pVNTR:** es un repetido de 30pb, ubicado en el cromosoma X, en posición Xp11.23 (Sabol *et al.*, 1998).
- **IL1-RN VNTR:** es un repetido de 86pb, este gen se ubica en el cromosoma 2 en la posición 2q13-q14.2 (You *et al.*, 2007; Tarlow *et al.*, 1993).

También se analizaron dos mutaciones de punto (SNP) del gen **COMT:** **rs4680** y **rs4818**, ubicados en el cromosoma 22, en la posición 22q11.21-q11.23 (Vargas-Alarcon *et al.*, 2007).

En la tabla 2 se detallan la ubicación cromosómica, la secuencia motivo repetida, el tamaño en pares de bases y los alelos más frecuentes observados en las poblaciones humanas observadas.

Nombre del Marcador	Ubicación Cromosómica	Secuencia repetida 5'-3'	Tamaño en pb	Alelos
rs4680	22q11.21-q11.23		68+23+18=109=A, 86+23=109=G	A , G
rs4818	22q11.21-q11.23		180	C ,G
IL1-RN-VNTR	2q13-q14.2	*	240-584	2, 3, 4,5, 6**
MAO-ApVNTR	Xp11.23	ACC(A/G/C) _s G(C/T) _s	179-266	2, 3, 3,6, 4, 5.***

Tabla 2. Marcador analizado, ubicación cromosómica, secuencia motivo repetida, tamaño en pares de bases, alelos más frecuentes de cada marcador analizado.

* Secuencia repetida:
ACATGGAACAACATCCAGGAGACTCAGGCCTCTAGGAGTAACTGGGTAGTGTGCATCCTGGG
GAAAGTGAGGGAAATATGGACATC

** Los alelos de IL1-RN denominados según la cantidad de repeticiones que presentan (Havemose-Poulsen *et al.*, 2007)

*** Los alelos de MAO-A corresponden al número de repeticiones, esta nomenclatura fue asignada basándonos en el trabajo de Yu y colaboradores 2005.

AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR

Para la amplificación de las secuencias de ADN de interés se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(Figura 4). Esta técnica consiste en la síntesis *in vitro* de una secuencia de ADN diana, la cual comienza con la alineación de un par de cebadores o iniciadores (*primers*) a la misma, a partir de ADN genómico. Para la etapa de síntesis se utiliza una enzima ADN-polimerasa termorresistente, que es capaz de realizar numerosos ciclos de polimerización a 72°C. El resultado de la reacción de PCR es una multiplicación geométrica del fragmento de ADN de interés (Mullis 1990; Erlich *et al.*, 1991).

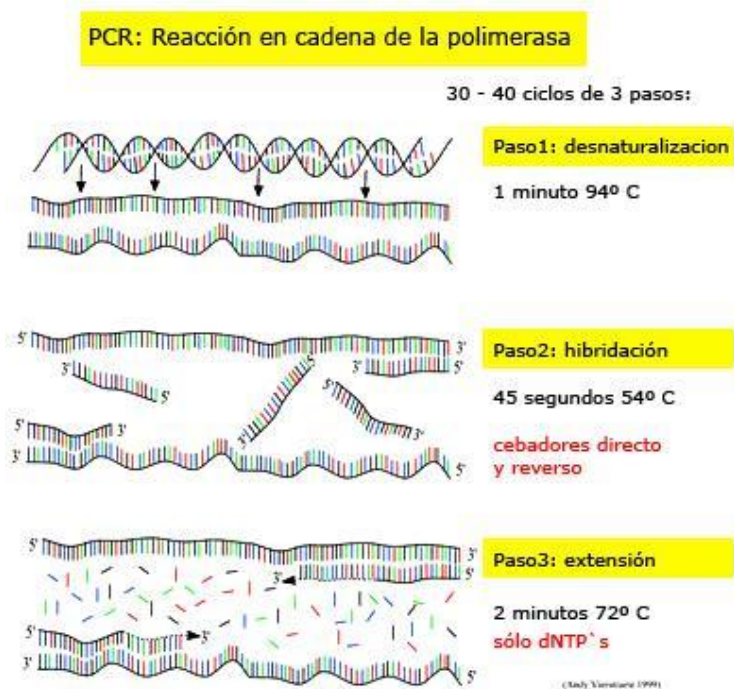


Figura 4. Mecanismo de amplificación de la técnica PCR Tomado de: http://biodist.com/biologia_mol.html

Para el análisis de ADN repetido se amplificaron las repeticiones agrupadas en tándem del minisatélite y para el SNP rs4680 la región donde se encuentra el cambio y una pequeña región flanqueante a cada lado del cambio y de las repeticiones. Para el SNP rs4818, se utilizó un cebador *forward* y dos cebadores *reverse*, estos últimos específicos de alelo, dado que cada uno de los cebadores *reverse* posee un nucleótido terminal diferente, y complementario a un alelo determinado del polimorfismo en cuestión. La secuencia de los cebadores utilizados se detalla a continuación:

rs4680

Fw: 5'-CCA GGT CTG ACA ACG GGT CA-3'

Rw: 5'-ACA AGA ACG AAA CTC CAA CTC-3'

rs4818

Fw-G: 5'-TCG GGG TTG ATC TCG ATG GTG ATG-3'

Fw-C: 5'-TCG GGG TTG ATC TCG ATG GTC ATC-3'

Rw: 5'-GCA AGA TCG TGG ACG CCG TGA TTC AG-3'

MAO-ApVNTR

Fw: 5'-CAG CGC CCA GGC TGC TCC AGA AAC-3'

Rw: 5'-GGT TCG GGA CCT GGG CAG TTG TGC-3'

IL1-RN-VNTR

Fw: 5'-CTC AGC AAC ACT CCT AT-3'

Rw: 5'-TCC TGG TCT GCA GGT AA-3'

REACCIONES DE PCR

Para una reacción de PCR de 10 µl finales se utilizaron:

- 1% buffer de PCR (50 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM de ClNa, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 50% de glicerol y 1% de Tritón®X-100),
- 2 mM de Cl₂Mg,
- 0,2 mM de dNTPs,
- 2,5 pmol de oligonucleótidos cebadores,
- 0,25 U de Taq ADN polimerasa (Promega, Madison, USA) y
- 10ng de ADN o 3 ul de solución de ADN obtenida mediante Chelex 100®.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de marca MPI-02-Evo (La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina).

En la tabla 3.a se especifica las condiciones de ciclado para el marcador rs4680.

rs4680	T°	Tiempo
--------	----	--------

Desnaturalización inicial	94°	3 minutos
Desnaturalización	94°	12 segundos
Hibridación (annealing)*	60°-57°	25segundos
Extensión	72°	30 segundos
Extensión final	72°	5 minutos
Total de ciclos: 38		

3.a- rs4680 (modificado de Huerta *et al.*, 2007).

En la tabla 3.b se especifica las condiciones de ciclado para el marcador rs4818.

rs4818	T°	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	3 minutos
Desnaturalización	92°	45 segundos
Hibridación (annealing)*	72°-66°	72 segundos
Extensión	72°	72 segundos
Extensión final	72°	10 minutos
Total de ciclos: 36		

3.b- rs4818 (puesto a punto en nuestro laboratorio).

En la tabla 3.c se especifica las condiciones de ciclado para el marcador MAO-A pVNTR.

MAO-A pVNTR	T°	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	5 minutos
Desnaturalización	94°	30 segundos
Hibridación (annealing)*	55°-52°	30 segundos
Extensión		40 segundos
Extensión final	72°	8 minutos
Total de ciclos: 38		

3.c- VNTR-MAO-A (modificado de Huang *et al.*, 2004).

En la tabla 3.d se especifica las condiciones de ciclado del marcador IL1-RN-VNTR.

IL1-RN-VNTR	T°	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	2 minutos
Desnaturalización	93°	30 segundos
Hibridación (annealing)*	59°-55°	1 minuto
Extensión	72°	1 minuto
Extensión final	72°	10 minutos
Total de ciclos: 38		

3.d- IL1-RN-VNTR (modificado de Havemose-Paulsen *et al.*, 2007).

* En los sucesivos ciclos de la reacción de PCR, se realizó un descenso gradual de la temperatura de hibridación denominado “*touch-down*”. Éste tiene por objeto establecer condiciones más estrictas de amplificación durante los primeros ciclos de PCR, a fin de obtener un producto amplificado de alta especificidad y luego, en los ciclos posteriores, las condiciones de hibridación se relajan gradualmente para obtener abundante producto, utilizando como molde al amplificado específico de los primeros ciclos.

DIGESTION ENZIMATICA

Los genotipos del SNP rs4680 se determinaron con la técnica RFLP, ya que la variación de la secuencia de ADN tiene como consecuencia un cambio en un sitio de restricción y así genera según este o no el sitio, fragmentos de diferente longitud dependiendo del alelo presente (Luque-Cabrera, 2002). Los amplicones (=productos de PCR) fueron digeridos por la enzima de restricción *Hsp92II*, la cual posee el siguiente sitio de corte:

5'...C A T G ↓...3'

3'...↑ G T A C...5'.

Para la digestión con *Hsp92II* se prepararon reacciones de 16ul finales siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (Promega Corp.). La reacción (10ul de mix de digestión + 6ul de amplicón) se incubó durante 2 horas a 37°C, y luego 20 minutos a 65°C para inactivar la enzima.

Las bandas resultantes de la digestión fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata, previa electroforesis en geles de poliacrilamida neutra.

ELECTROFORESIS:

Mediante la técnica de electroforesis se separan macromoléculas cargadas. El desplazamiento de las mismas en un campo eléctrico se produce con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño.

Los soportes utilizados para electroforesis de fragmentos de ADN incluyen geles de poliacrilamida, que separan fragmentos pequeños (aproximadamente 1 a 1000pb) y geles de agarosa que separan fragmentos de mayor tamaño y con menor resolución que los primeros (hasta 20kpb) (Luque-Cabrera, 2002).

GELES DE POLIACRILAMIDA

Poliacrilamida neutra: Para el análisis de los fragmentos del SNP rs4680 obtenidos de la digestión enzimática, se utilizaron geles de poliacrilamida neutros. Se prepararon los geles neutros al 6% partiendo de:

- Acrilamida-bisacrilamida 40%
- TBE (Tris-Acido bórico 45mM-EDTA 1mM) 0,5X.
- Agua MQ

La electroforesis se realizó en una cuba electroforética acrílica (Aladdin, USA) sembrando 6 µl de cada muestra con 2,5 µl de solución de carga neutra. Esta última contiene 0,25% de xileno cianol, 0,25% de azul de bromofenol y 30% de glicerol en agua (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó el mismo Buffer de corrida (TBE 0,5X) que para la preparación del gel. Como control se utilizó una escalera de 100 pb 100 Marker® (Biodynamics). Las corridas electroforéticas se realizaron a 40 Volt/cm y 20 Watt, durante 1 hora.

Poliacrilamida desnaturalizante: Para el análisis del VNTR de MAO-A se utilizaron geles de poliacrilamida, estos ofrecen gran poder de resolución y se prefieren para separar los alelos de marcadores minisatélites, que se diferencian entre sí por unos pocos pares de bases, generalmente menos de 100 (Sambrook *et al.*, 1989).

Se prepararon geles de poliacrilamida desnaturalizante al 6% modificado de Sambrook y colaboradores (1989), según se detalla:

- Urea 8 M
- Acrilamida-bisacrilamida 40%
- TBE (Tris-Acido bórico 45mM-EDTA 1mM) 0,5X
- Agua MQ

La electroforesis se realizó en una cuba electroforética acrílica (Aladdin, USA), sembrando entre 3 y 4µl de cada muestra con 2,5µl de solución de carga desnaturalizante. Esta última contiene 90% de formamida deionizada, 10mM de EDTA pH8, 0,025% de xileno cianol y 0,025% de azul de bromofenol (Sambrook *et al.*, 1989). El Buffer de corrida utilizado fue el TBE 0,5X, el mismo que para el preparado del gel.

Para determinar el tamaño molecular de las bandas, se utilizaron escaleras comerciales GenePrint® y productos amplificados de individuos de referencia. Las corridas electroforéticas se realizaron a 40 Volt/cm (1500 Volt) y 45 Watt, durante 3 horas.

TINCIÓN DEL GEL

Se procedió a la tinción del gel de acrilamida con sales de plata para visualizar las bandas electroforéticas. La técnica consistió en:

- fijación en ácido acético al 10% durante 20 minutos,
- 3 lavados de 2 minutos cada uno, con agua desionizada,
- tinción con nitrato de plata (AgNO_3) al 1%, durante 30 minutos,
- lavado con agua deionizada de 10 segundos,
- revelado en solución 3% p/v de carbonato de sodio (CO_3Na) y formaldehído al 0,15%; la reacción de revelado se detiene con ácido acético al 10% una vez que las bandas de ADN en el gel se han teñido.

Posteriormente, se procedió a la lectura del gel e identificación de los alelos correspondientes a cada muestra.

GELES DE AGAROSA

Para el análisis del VNTR de IL1-RN y el SNP rs4818 se utilizaron geles de agarosa debido a que los amplicones fueron de fácil resolución. Se utilizó agarosa al 2% (Promega Corp.) en solución TAE 1X (Tris-Base 40mM; EDTA 1mM pH 8) y utilizando el mismo buffer para la posterior corrida. La tinción de los geles se realizó con 10 ul SYBR-SAFE en 250 ul de Buffer TAE 1X. Para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos, en el mismo gel se sembró el marcador comercial 100-MARKER® (Biodynamics).

CALCULOS ESTADISTICOS

FRECUENCIAS ALELICAS Y FRECUENCIAS GENOTIPICAS

Cuando se estudian poblaciones, un parámetro importante son las frecuencias alélicas o proporciones de los distintos alelos de un gen en una población (Strickberger 1976) pues el cambio genético de una población se describe a partir del cambio de sus frecuencias alélicas (Nei 1987).

Las frecuencias alélicas se estimaron mediante el recuento de los alelos de cada muestra, para cada locus (Li 1976) utilizando la siguiente fórmula:

$$P_i = n_i/T$$

donde n_i es el número de alelos i observados en la población y T es la cantidad total de alelos observados para un locus determinado.

El desvío estándar de las frecuencias alélicas es una medida de la desviación típica de la distribución de muestreo. Se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\sigma = \sqrt{[p_i(1 - p_i)] / (2N)}$$

donde N es el número de individuos de la población.

Las frecuencias alélicas se graficaron utilizando el programa comercial Prism 5.0.

Las frecuencias genotípicas corresponden a las proporciones de los distintos genotipos de un locus en una población. Para calcularlas, se contaron los diferentes genotipos hallados en las dos poblaciones y se usó la fórmula:

$$P_{ij} = n_{ij}/N$$

Donde n_{ij} es la cantidad de veces que se observa el genotipo con alelos i y j en la población.

El cálculo de frecuencias genotípicas se realizó para todos los marcadores, excepto para los varones en el VNTR de MAO-A debido a que el mismo se encuentra ubicado en el cromosoma X y sólo en las mujeres es diploide. En los varones presenta un solo alelo, presentando haplotipos.

FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS

Para el VNTR de MAO-A, se calcularon las frecuencias haplotípicas para los varones analizados de las dos poblaciones; el cálculo realizado fue el siguiente:

$$P_i = n_i/N$$

Donde n_i es la cantidad de veces que se observa el haplotipo i en una muestra de N varones.

ESTRUCTURA POBLACIONAL

EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG:

Para estimar si las poblaciones analizadas mantienen sus frecuencias genotípicas constantes de una generación a otra, se ha evaluado su ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000), mediante un test exacto, y utilizando cadenas de Markov (longitud 100.000). En el caso del VNTR de MAO-A, esta estimación se efectuó solamente a partir de los genotipos femeninos por ser los varones hemocigotas para este marcador, imposibilitando el cálculo.

CALCULOS DE LA VARIABILIDAD POBLACIONAL

NUMERO DE ALELOS

Cuando se observa un número elevado de alelos, estamos ante un grado de polimorfismo elevado (Nei, 1987). El cálculo del número de alelos hallados se obtiene contando el número de alelos observados para cada locus y para cada muestra, y es una forma sencilla de medir la variabilidad genética.

En el caso de polimorfismos multialélicos (más de dos variantes alélicas) es de importancia el cálculo del *número efectivo de alelos*. Ésta es una medida de variabilidad poblacional que iguala el número real de alelos sólo cuando todos los alelos tienen la misma frecuencia, siendo esta situación la de máxima variación para dicho polimorfismo; de lo contrario, n_e es menor que n . Por lo tanto, el n_e refleja la disparidad en las frecuencias de los distintos alelos, mostrando cuán variable es el marcador analizado (Nei, 1987).

El número efectivo de alelos se define como el recíproco de la homocigosis y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$n_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$$

donde p_i es la frecuencia alélica de cada uno de los n alelos observados.

Otra medida de variabilidad poblacional es el número medio de alelos (n_x), el cual se calcula sumando todos los alelos para cada marcador y dividiendo esto por el número de marcadores analizados. Esta estimación es de interés para polimorfismos multialélicos, como es el caso de los VNTR de MAO-A e IL1RN.

HETEROCIGOSIS OBSERVADA

Para cada marcador se ha calculado la proporción de individuos heterocigotas de la población mediante la siguiente fórmula:

$$H = n_h / N$$

donde n_h es el número de individuos heterocigotas observados en una muestra de N individuos.

HETEROCIGOSIS MEDIA

Cuando analizamos varios marcadores en una misma población, podemos calcular la heterocigosidad media, mediante la cual podemos conocer el nivel medio de variabilidad genotípica de dicha población. Se calcula efectuando un promedio de los valores hallados en cada muestra.

$$H = \frac{\sum h_i}{k}$$

dónde h_i es la heterocigosidad de cada marcador en la población en cuestión y k es el número de marcadores analizados.

HETEROCIGOSIS ESPERADA O DIVERSIDAD GÉNICA POBLACIONAL

Según el equilibrio de Hardy-Weinberg, los valores esperados de heterocigosis se calculan como la unidad menos la suma de cuadrados de las frecuencias alélicas:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

donde p_i son las frecuencias alélicas de los n alelos observados.

COMPARACIÓN DE LA VARIACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES

Cuando hablamos de variación génica total de una población, podemos discriminar dos componentes de esta variabilidad:

- la variabilidad intrapoblacional, es la que se da entre individuos de una misma población. Se calcula realizando la sumatoria de los valores de heterocigosis observada en los distintos marcadores analizados.

$$V. \text{ dentro} = \Sigma H$$

- la variabilidad interpoblacional, generalmente es un componente de menor magnitud que el anterior y mide la diferencia genética entre poblaciones.

$$V. \text{ entre} = V. \text{ total} - V. \text{ dentro}$$

INDICE DE WRIGTH F_{st}

El F_{st} mide el grado de diferenciación genética entre poblaciones, comparando los valores de heterocigosis de las poblaciones tomadas en conjunto con la heterocigosis de cada población particular. El valor de F_{st} es equivalente al coeficiente de diferenciación génica G_{st} , y mide la proporción de diversidad génica que está distribuida entre las poblaciones (Paz et al., 2003). Se calcula mediante la fórmula:

$$F_{st} = \frac{\sum P_i (1 - P_i) \cdot F_{sti}}{\sum P_i (1 - P_i)}$$

donde P_i es la frecuencia ponderada de cada alelo y F_{sti} es una estimación que corresponde al aporte que realiza cada alelo particular del marcador a la variabilidad entre las poblaciones.

El cálculo de F_{st} se realizó mediante el programa Arlequín 2.00 (Schneider *et al.*, 2000) bajo la hipótesis de neutralidad (ausencia de selección) y equilibrio poblacional, usando un algoritmo de coalescencia adaptado de Hudson (1990). Para calcular esta significancia se estima un valor P que se obtiene como la proporción de estadísticos F_{st} calculados al azar.

El valor de F_{st} puede tomar un valor que va de cero a uno, siendo $F_{st} = 0$ indicativo de ausencia de subdivisión dentro de la población total, mientras que un valor elevado de F_{st} indica una población constituida por subpoblaciones que mantienen un escaso flujo génico, lo cual hace que existan diferencias entre ellas. Al contrario del valor de heterocigosis, este índice expresa una proporción que es comparable entre los distintos loci estudiados sin importar diferencias en el tamaño de las muestras analizadas (Paz *et al.*, 2003).

ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR = AMOVA

La estructura genética de la población fue analizada por medio de análisis de varianza molecular, utilizando el programa Arlequín 2.00 (Schneider *et al.*, 2000). Este programa utiliza un método de cálculo basado en el análisis de las frecuencias alélicas, pero teniendo en cuenta el número de mutaciones ocurridas entre las distintas variantes moleculares (pasos mutacionales). Dado que se analizaron muestras pertenecientes a sólo dos poblaciones, en el análisis de estructura no se definieron “grupos de muestras”, sino que la contrastación se limitó al análisis “dentro” y “entre” muestras (Schneider *et al.*, 2000).



Se presentan los resultados obtenidos para cada marcador obtenidos a partir de las muestras bonaerense y misionera, incluyendo frecuencias alélicas y genotípicas, ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg, número de alelos y estimación de heterocigosis. Posteriormente se presenta la comparación de ambas muestras para conocer la variación existente entre las poblaciones de las dos provincias (AMOVA y Fst).

Polimorfismos del gen COMT: rs4680 y rs4818

El marcador rs4680 consiste en una mutación de punto que lleva a un cambio aminoacídico Val/Met, que fue analizado utilizando la enzima de restricción Hsp92II. Con esta enzima se realizó la digestión de un fragmento amplificado de 109pb; la restricción generó tres posibles combinaciones de bandas:

- bandas de 86 y 23 pb, que corresponden a los homocigotos Val/Val
- bandas de 68, 18 y 23 pb, para los homocigotos Met/Met
- bandas de 86, 68, 23 y 18 pb, en los heterocigotos Val/Met.

En los geles de poliacrilamida neutra fue posible visualizar las bandas de 86 y 68 pb, mientras que las bandas de tamaño pequeño al migrar con mayor velocidad, escapan del gel no siendo posible su observación (Figura 5).

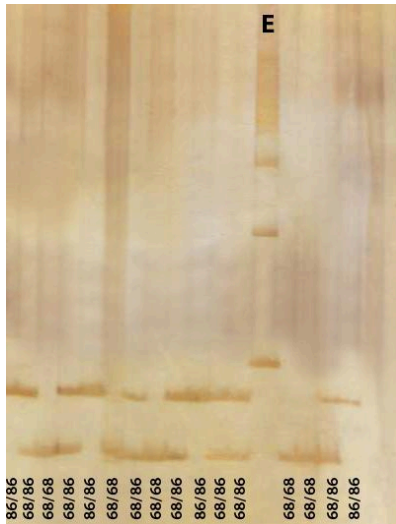


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida neutra, de los productos de restricción para rs4680 (E: escalera de referencia CienMarker, 68/86: A/G,68/68: A/A, 86/86: G/G).

En la figura 6 y las tablas 4.a, y 4.b se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en Misiones y Buenos Aires para el marcador rs4680. Al analizar las distribuciones alélicas, observamos que ambos alelos, A y G, presentaron una distribución similar en ambas muestras, siendo el alelo G, en un pequeño porcentaje más frecuente; lo cual se ve reflejado en la distribución genotípica, ya que el genotipo más frecuente tanto para la población misionera y como para la bonaerense ha sido el heterocigota A-G, y a continuación el homocigota G-G.

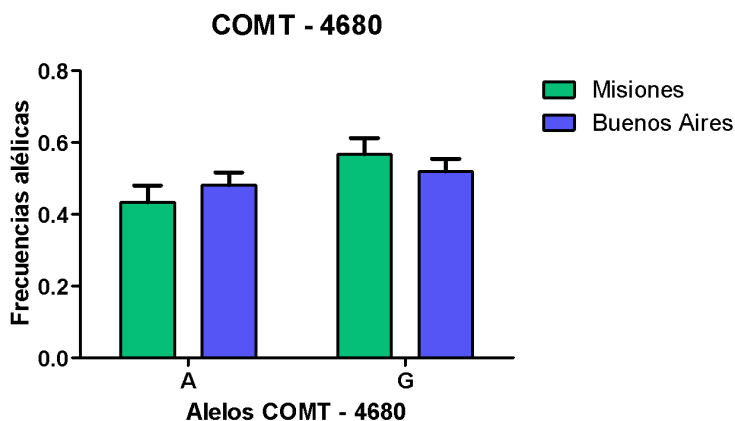


Figura 6. Frecuencias alélicas obtenidas para rs4680.

Alelo	Misiones (60)	Buenos Aires (107)
A	0,433+/-0,045	0,481+/-0,034
G	0,566+/-0,045	0,581+/-0,034

Tabla 4.a. Frecuencias alélicas obtenidas para rs4680 (entre paréntesis, tamaño muestral).

Genotipo	Misiones (60)	Buenos Aires (107)
AA	0,116	0,168
AG	0,633	0,626
GG	0,25	0,205

Tabla 4.b Frecuencias genotípicas obtenidas para rs4680 (entre paréntesis, tamaño muestral).

En la comparación de heterocigosis observadas y esperadas no se observaron desajustes al equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 4.c), para el marcador rs4680.

	Misiones	Buenos Aires
Heterocigosis observada	0.64151	0.62766
Heterocigosis esperada	0.49596	0.51320
valor P	0.04797 +/- 0.00063	0.02154 +/-0.00044

Tabla 4.c Estimación del ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg para rs4680 y rs4818.

Con respecto al marcador rs4818, también consiste en un SNP que a diferencia del anterior, no genera un cambio aminoacídico en la proteína. Este marcador de punto se analizó utilizando cebadores *forward* específicos de alelo con un cebador *reverse* común a ambas variantes. En los individuos homocigotas amplificará sólo uno de los dos cebadores *forward*, mientras que en los heterocigotas habrá amplificación con ambos cebadores. La ausencia o presencia de estas bandas se determinó en geles de agarosa 2% en buffer TAE 1X (Figura 7).



Figura 7. Gel de agarosa 2% en TAE 1X.

En la figura 8 y las tablas 5.a , y 5.b se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en las muestras de Misiones y Buenos Aires para rs4818. Para este polimorfismo se observó una gran diferencia en la distribución alélica, ya que el alelo G fue el doble más frecuente que el alelo C, en ambas muestras, y los genotipos hallados más frecuentemente fueron el heterocigota G-C, y el homocigoto GG.

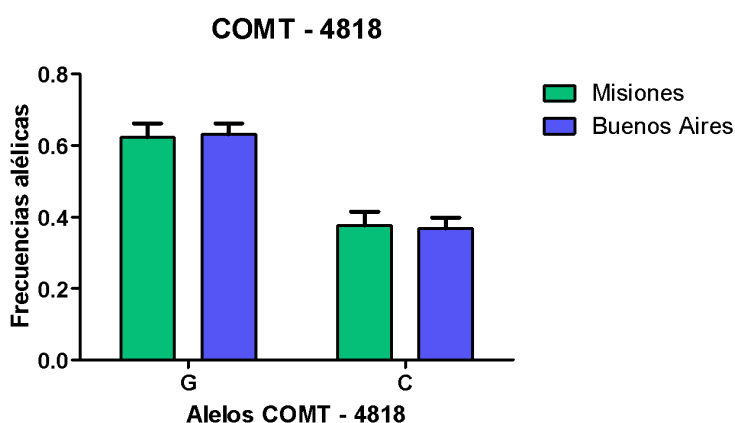


Figura 8. Frecuencias alélicas obtenidas para rs4818.

Alelo	Misiones (81)	Buenos Aires(125)
G	0,623+/-0,038	0,632+/-0,030
C	0,376+/-0,038	0,368+/-0,030

Tabla 5.a. Frecuencias alélicas obtenidas para rs4818 (entre paréntesis, tamaño muestral).

Genotipo	Misiones (81)	Buenos Aires(125)
GG	0,345	0,344
GC	0,555	0,576
CC	0,098	0,08

Tabla 5.b Frecuencias genotípicas obtenidas para rs4818 (entre paréntesis, tamaño muestral).

Para este marcador no se ha observado desequilibrio de Hardy-Weinberg para ambas muestras (Tabla 5.c).

	Misiones	Buenos Aires
Heterocigosis observada	0.52830	0.56383
Heterocigosis esperada	0.49434	0.46860
valor P	0.55572 +/- 0.00163	0.04333 +/-0.00072

Tabla 5.c Estimación del ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg para rs4818.

Cuando analizamos las varianzas entre y dentro de las poblaciones para ambos marcadores, arrojó los siguientes resultados: varianza entre: -0,0008, varianza dentro: 0,483, con valores de Fst de: -0,00165 y de P: 0.37048+/-0.01431.

Polimorfismo del gen MAO-A: VNTR-MAO-A

La tipificación de las variantes alélicas del VNTR-MAO-A se realizaron en geles de poliacrilamida desnaturalizante, estas variantes están dadas por el tamaño de las repeticiones de la secuencia de 30 pb (Figura 9). Para la nomenclatura de los alelos se utilizó la cantidad de repeticiones que presenta el VNTR de acuerdo con Yu y colaboradores (2005) dado que las nomenclaturas alternativas propuestas en la bibliografía resultan en una mayor confusión (Sabol et al. 1998, Deckert et al. 1999, Gürsoy et al. 2008). Este polimorfismo presenta un alelo imperfecto que además de tres repeticiones, contiene una unidad de repetición incompleta adicional, de sólo 18 pb, por lo cual es llamado “3,6”(Yu et al. 2005).



turalizante.

En la figura 10 y las tablas 6.a, 6.b, y 6.c se presentan las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas respectivamente, obtenidas en misioneros y bonaerenses para el VNTR-MAO-A. Dado que el gen MAO-A se encuentra ubicado en el cromosoma X, las mujeres presentan genotipos (diploides) mientras que los varones, al poseer un solo cromosoma X, presentan haplotipos; es por esto que los datos se presentan desdoblados en las tablas 6.b y 6.c.

En el análisis de este marcador se identificaron 5 alelos en ambas muestras, la misma cantidad de alelos que ha sido reportados en la bibliografía (Sabol *et al.*, 1998; Deckert *et al.*; 1999; Yu *et al.*, 2005; Gürsoy *et al.*, 2008). La distribución alélica resultó similar para los alelos más frecuentes (3 y 4) entre las dos poblaciones analizadas, pero en la muestra de Misiones el alelo 3,6 resultó un poco más frecuente que en Buenos Aires, mientras que los alelos 2 y 5 solamente se hallaron en mujeres de la muestra de Buenos Aires, en heterocigosis. De acuerdo con estos hallazgos, los genotipos femeninos más frecuentes fueron el heterocigota 3-4 y el homocigota 4-4 en ambas provincias.

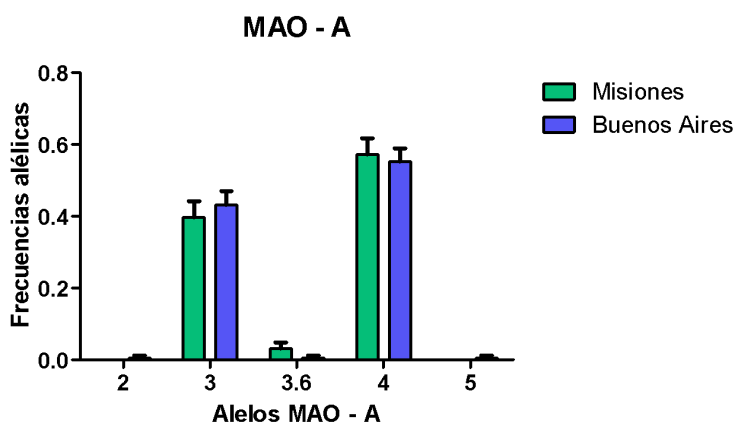


Figura 10. Frecuencias alélicas obtenidas para VNTR-MAO-A

Alelo	Misiones (78)	Buenos Aires (116)
2	0+/-0	0,005+/-0,005
3	0,396+/-0,043	0,431+/-0,037
3,6	0,031+/-0,015	0,005+/-0,005
4	0,571+/-0,044	0,551+/-0,037
5	0+/-0	0,005+/-0,005

Tabla 6.a Frecuencias alélicas obtenidas para VNTR-MAO-A (entre paréntesis, tamaño muestral).

Genotipo	Misiones (48)	Buenos Aires (60)
2-3	0	0,016
3-3	0,166	0,216
3-3,6	0,02	0
3-4	0,458	0,45
3,6-4	0,041	0
4-4	0,31	0,3
4-5	0	0,016

Tabla 6.b. Frecuencias genotípicas (mujeres) obtenidas para VNTR-MAO-A (entre paréntesis, tamaño muestral).

Alelo	Misiones (30)	Buenos Aires (56)
3	0,393	0,367
3,6	0,018	0,033
4	0,589	0,600

Tabla 6.c Frecuencias haplotípicas (varones) obtenidas para VNTR-MAO-A (entre paréntesis, tamaño muestral).

En la comparación de heterocigosis observadas y esperadas no se observaron desajustes al equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 6.d), si bien las frecuencias alélicas masculinas y femeninas no fueron idénticas.

	Misiones	Buenos Aires
Heterocigosis observada	0,520	0,483
Heterocigosis esperada	0,479	0,516
valor P	1,000+/-0,000	0,637+/-0,001

Tabla 6.d Estimación del ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg para MAO-A

En el caso de las muestras masculinas, no es posible estimar el ajuste de este marcador al equilibrio de Hardy-Weinberg ya que los varones son hemicigotas para la información ubicada en la región específica del cromosoma X. De la misma manera, no puede calcularse heterocigosis observada, pero la diversidad génica, equivalente a la heterocigosis esperada de los marcadores diploides, fue de 0,5071 +/- 0,0332 para los varones bonaerenses y de 0,5218 +/- 0,0558 para los misioneros.

El análisis comparativo entre las muestras de los varones de ambas poblaciones mostró una variación interna muy elevada dentro de las dos muestras, con un valor de F_{st} muy bajo, de -0,02 ($P=0,903$). De la misma manera, los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) presentaron componentes de la varianza de 0,95 (dentro) y -0,02 (entre). Para el caso de las mujeres de ambas muestras misioneras y bonaerenses en el análisis de la varianza entre poblaciones se obtuvo un valor de -0,006, y dentro de cada muestra un valor de 1,002, con un valor de F_{st} de -0,00678, y un P de 0,66645+-0,0082, lo cual nos indica de que no existen diferencias entre las muestras analizadas.

Polimorfismo del gen IL1RN: VNTR-IL1RN

Para este marcador, a partir de las reacciones de PCR se obtuvieron bandas entre 240-500pb, las cuales se resolvieron en geles de agarosa 2% (Figura 11). Los alelos hallados fueron 2, 4 y 5, denominados de acuerdo con la cantidad de repeticiones que presentan.

En la figura 12 y las tablas 7.a, y 7.b se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en Misiones y Buenos Aires. En las muestras analizadas el alelo 4 fue el más frecuente, al igual que el genotipo homocigota 4-4, el cual alcanza un valor cercano a 1 sobre todo en los misioneros, haciendo a este marcador poco polimórfico.

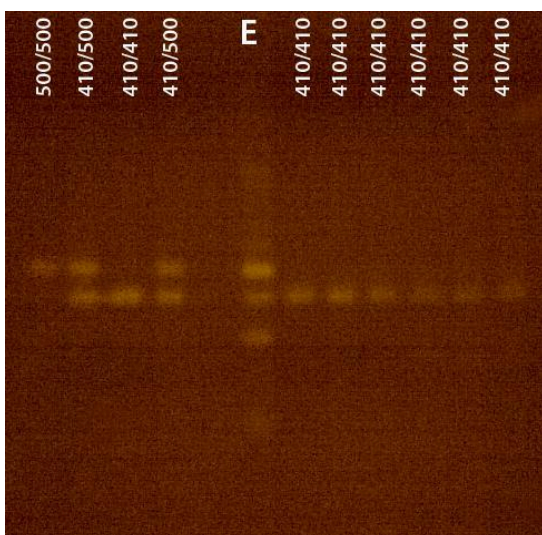


Figura 11. Electroforésis en gel de agarosa 2% del VNTR-IL1RN

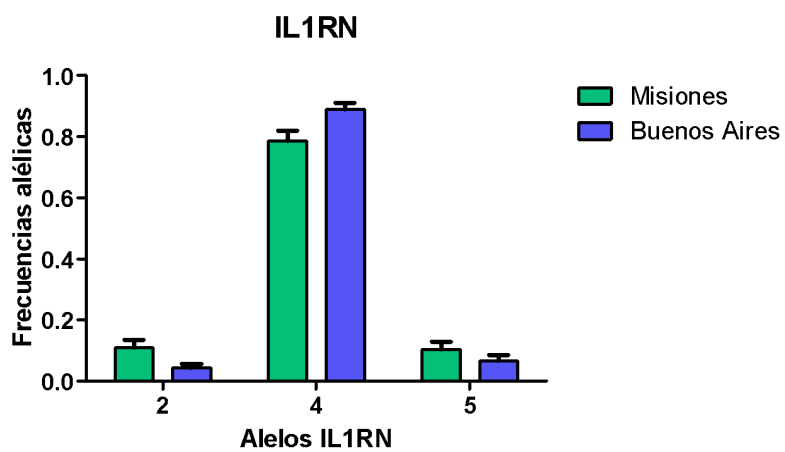


Figura 12. Frecuencias alélicas obtenidas para VNTR-IL1-RN.

Alelo	Misiones (77)	Buenos Aires (104)
2	0,11+/-0,025	0,043+/-0,014
4	0,785+/-0,033	0,889+/-0,021
5	0,103+/-0,069	0,067+/-0,017

Tabla 7.a. Frecuencias alélicas obtenidas para VNTR-IL1-RN.

Genotipo	Misiones (77)	Buenos Aires (104)
2-2	0,064	0,038
2-4	0,077	0,009
2-5	0,01	0
4-4	0,95	0,875
4-5	0,01	0,019
5-5	0,09	0,057

Tabla 7.b. Frecuencias genotípicas obtenidas VNTR-IL1-RN.

Se observaron desajustes al equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 7.c), en la comparación de heterocigosis observadas y esperadas. Cuando analizamos la varianza entre poblaciones, obtuvimos un valor de 0,002, y dentro de cada población un valor de 0,368. Los valores de F_{st} y P fueron de 0,007 y 0.26182 ± 0.0076 .

	Misiones	Buenos Aires
Heterocigosis observada	0.10390	0.02885
Heterocigosis esperada	0.36712	0.20443
valor P	0,000 \pm 0,000	0.000 \pm 0.000

Tabla 7.c Estimación del ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg para IL1RN

Análisis de loci combinados

El número efectivo de alelos estuvo por debajo del número de alelos observados para ambos VNTR MAO-A y IL1RN en ambas poblaciones, dada la preponderancia de uno o dos alelos de frecuencia elevada (alelo 4 en IL1, alelos 3 y 4 en MAO-A)(Tabla 8). El número medio de alelos para los VNTR MAO-A e IL1RN para la muestra de Misiones fue de 3 alelos, y para la muestra de Buenos Aires fue 4 alelos, ya que la población bonaerense presentó mayor cantidad de alelos para el VNTR-MAO-A.

VNTR-MAO-A	Número efectivo de alelos	Número total de alelos
Misiones	1,004	3
Buenos Aires	1,006	5
VNTR-IL1RN		
Misiones	1,004	3
Buenos Aires	1,085	3

Tabla 8. Número efectivo de alelos, y número total de alelos de cada población analizada.

Para los VNTR MAO-A y IL1RN se presentaron valores de heterocigosis media mayores en los misioneros en comparación a los bonaerenses, en cambio para los SNPs rs4680 y rs4818 el resultado fue inverso, con un valor levemente diferente entre ambas poblaciones (Tablas 9 y 10).

	Misiones	Buenos Aires
VNTR-MAO-A, VNTR-IL1RN	0,311	0,255

Tabla 9. Heterocigosis media de cada población analizada para los VNTR MAO-A e IL1RN.

	Misiones	Buenos Aires
rs4680,rs4818	0,594	0,601

Tabla 10, Heterocigosis media de cada población analizada para los SNPs rs4680 y rs4818.



La actual población de nuestro país esta constituida en su mayoría por descendientes de inmigrantes de diferentes partes del mundo, en su mayoría de procedencia europea debido a dos grandes influencias migratorias de españoles e italianos. No obstante en los últimos 30 años el origen de los individuos que llegan a nuestro país ha cambiado notablemente, el índice inmigratorio apunta en su mayoría a países de nuestro continente que poseen un componente amerindio elevado como Bolivia, Paraguay y Perú, pero también a países tan diversos y de continentes tan remotos como África y Asia (Corea del sur, China), es así que actualmente conviven en un mismo territorio individuos con gran diferencia de características físicas y culturales. La contribución indígena y africana se encuentra, de este modo en aumento y la europea en descenso (Avena *et al.*, 2006).

En este marco actual se planteó el objetivo de constatar si esta variabilidad de caracteres se expresa también a nivel genético, en particular en los genes que codifican enzimas relacionadas con la percepción del dolor; ya que estudios genéticos han demostrado que la población Argentina presenta aún un componente genético caucasoide o europeo elevado, en el orden del 78-80%, un 15.8% indígena y un 4.3% africano. (Avena *et al.*, 2006; Seldin *et al.*, 2006).

Corach publicó resultados en el año 2005 de una investigación realizada desde el año 1992, sobre un total de 12.000 individuos de 11 provincias, que indicaba que el 56% de la población Argentina tiene por lo menos un antepasado indígena americano; de este porcentaje, un 10% de la población tiene todos sus antepasados indígenas mientras que el restante 46% comparte antepasados indígenas y no indígenas. El 44% restante de la población total, no tiene ascendencia indígena (<http://www.indigenas.bioetica.org/nota28.htm>).

Para lograr determinar si esta variable de origen poblacional conlleva una modificación en la composición genética de los elementos que determinan la percepción del dolor tomamos como referencia las enzimas COMT y MAO-A que se encuentran participando en la degradación de neurotransmisores (Nackley *et al.*, 2006, Huerta *et al.*, 2007, Erdal *et al.*, 2003), los cuales participan de la transmisión de la sensación dolorosa. La sensación de dolor se produce cuando llegan a distintas áreas del SNC estímulos que producen como resultado no sólo una respuesta refleja, sensación desagradable, sino también una respuesta emocional (López Timoneda, 1996). En la percepción del dolor también influye la respuesta inflamatoria, frente a ciertas afecciones, y con ésta la elevación de ciertas interleuquinas, entre ellas, IL-1 y su antagonista IL1RN, el cual regula la función de la primera, por ello el interés en el estudio de su variación genética.

La actividad enzimática de la enzima catecol-o-metil transferasa (COMT) se encuentra regulada por cuatro cambios de tipo SNP: el rs4680, rs6269, rs4633 y rs4818, formando haplotipos de baja sensibilidad al dolor (LPS), sensibilidad media (APS), y alta sensibilidad al dolor (HPS). El haplotipo LPS, se asocia con una alta actividad enzimática, el APS con una actividad media, y el HPS con una menor actividad enzimática. En este trabajo se analizaron dos de los cuatro SNPs mencionados anteriormente, rs4680 y rs4818.

En el análisis del rs4680, observamos que para ambas poblaciones los dos alelos (A y G) que forman el polimorfismo presentaron una distribución similar, encontrándose una frecuencia levemente mayor para el alelo G, al igual que españoles, caucásicos de Estados Unidos e individuos del suroeste asiático (Huerta *et al.*, 2007). La distribución genotípica hallada también fue similar a estas últimas poblaciones mencionadas, siendo el heterocigoto A/G el genotipo más prevalente y siguiendo a continuación el homocigoto GG. Con respecto a la actividad enzimática, los heterocigotas presentan una actividad media, ya que ambos alelos son codominantes, los homocigotos G/G una actividad alta, y los homocigotos A/A una actividad baja, afectando así a la degradación o inactivación dopaminérgica (Manisto *et al.*, 1999; Braver *et al.*, 1999).

El rs4818 C/G parece influir en la variación de la actividad de COMT, ya que los haplotipos HPS y APS contienen el alelo C, mientras el haplotipo LPS, el cual corresponde a una alta actividad de COMT, contiene el alelo G (Diatchenko *et al.*, 2005). En nuestras muestras misioneras y bonaerenses este SNP presentó frecuencias alélicas similares, siendo el alelo G, el doble de frecuente que el alelo C, al igual que lo descrito en la bibliografía para la población de Europa central (Roussos *et al.*, 2008). Sin embargo, esta similitud no se encontró en las frecuencias genotípicas, donde el genotipo heterocigota fue el más frecuente para ambas poblaciones analizadas, mientras que para Roussos, el genotipo más frecuente fue el G/G. Los valores obtenidos en nuestro estudio resultaron más afines con los porcentajes de heterocigosis encontrados en la población española (Vargas Alarcón *et al.*, 2007).

Con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg ambas poblaciones se ajustaron al equilibrio, para ambos rs4680 y rs4818, confirmando que tanto en misioneros como en bonaerenses no están ocurriendo procesos de endogamia, independientemente de las diferencias a nivel de genotipos diferentes.

Siguiendo en el análisis de los marcadores, para el VNTR-MAO-A, los resultados obtenidos también se han ajustado al equilibrio Hardy-Weinberg para ambas poblaciones. En nuestro análisis hemos encontrado los cinco alelos citados en la bibliografía (Deckert *et al.*, 1999; Gürsoy *et al.*, 2006; Sabol *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2005) pero los alelos 2 y 5 se observaron sólo en Buenos Aires. Estos alelos tampoco se han encontrado en el estudio realizado por Sabol *et al.* (1998) en los “latinos” (corresponde a blancos-hispanos), pero sí en las poblaciones italianas y alemanas analizadas por Deckert *et al.* (1999), excepto el alelo 2 que no ha sido encontrado por éste en la muestra alemana. El alelo 3,6 ha sido observado en mayor frecuencia en los misioneros, este alelo tampoco ha sido encontrado en los “latinos” analizados por Sabol *et al.* (1998). De manera que las diferencias observadas entre las dos provincias para este marcador podrían deberse al diferente aporte inmigratorio ocurrido en sendas regiones. Pero con respecto a las frecuencias alélicas y genotípicas han presentado valores muy semejantes. Los alelos más frecuentes fueron 3 y 4, al igual que las poblaciones de blancos no hispánicos (así llamados en la bibliografía), asiáticos, habitantes de las islas del pacífico, latinos y afroamericanos (Sabol *et al.*, 1998).

Dado que el gen MAO-A se encuentra ubicado en el cromosoma X, las mujeres presentan genotipos diploides mientras que los varones, al poseer un solo cromosoma X, presentan haplotipos; por ello no se puede calcular la heterocigosis observada para los hombres sí la diversidad génica, que es equivalente a la heterocigosis esperada de los marcadores diploides, y resultó muy similar en ambos grupos poblacionales.

Los genotipos más frecuentes fueron el heterocigota 3-4 y el homocigota 4-4, para ambas poblaciones, demostrando que las mismas son muy parecidas entre sí.

Con respecto a la actividad enzimática de MAO-A, la misma se ve afectada por la variabilidad de este VNTR, ya que el mismo se encuentra en el promotor del gen, así los diferentes alelos afectan a la transcripción del mismo. Los polimorfismos que lleven los alelos 3,6 y 4 transcriben de dos a diez veces más eficientemente que aquellos que llevan los alelos 2, 3 o 5 (Sabol *et al.*, 1998), otro autor propone que el alelo 3 contribuye a una baja actividad de MAO-A, y los alelos 3,6, 4 y 5 a una alta actividad de la enzima, afectando así a la degradación de los neurotransmisores (Gürsoy *et al.*, 2008).

El último marcador analizado fue un VNTR ubicado en el intrón 2 del gen de IL1-RN, que codifica el antagonista de IL1.

La IL-1 es una importante citoquina inflamatoria e inmunorreguladora, la producción elevada de la misma y su liberación produce daños patológicos (Velez-Castrillon *et al.*, 2004). También está implicada en la neurodegeneración y neuroregeneración (Licinio *et al.*, 1999). Durante los procesos inflamatorios aumentan los valores de IL-1, y del antagonista del receptor de IL1, este tiene una función reguladora sobre el receptor de IL1 (Velez-Castrillon *et al.*, 2004), actuando de forma inhibitoria, debido a que se une y cubre al receptor de IL1, por ello la importancia de su estudio, ya que una respuesta inflamatoria normalmente se relaciona con la percepción del dolor. Diversos estudios apoyan la idea de que el alelo 2 del VNTR-IL1RN, está relacionado con varias enfermedades inflamatorias que conllevan al dolor crónico, como ser osteoartritis, artritis idiopática juvenil, artritis reumatoidea, etc. (Maulenbelt *et al.*, 2004; Vencovsky *et al.*, 2001; Grover *et al.*, 2006).

En nuestras poblaciones analizadas hallamos solamente tres de los cinco alelos descritos en la bibliografía (Lee *et al.*, 2004), estos tres alelos fueron: el alelo 2 llamado también proinflamatorio (que corresponde a dos repeticiones), alelo 4 (4 repeticiones) y alelo 5 (5 repeticiones). El alelo 4 fue el más frecuente en ambas poblaciones, y presentó una frecuencia alélica muy similar entre las mismas. Los resultados obtenidos por Catanesi *et al.* (2005) para la población amerindia, muestran al alelo 2 con una frecuencia mayor que lo observado en las muestras objeto de este trabajo.

En Misiones y Buenos Aires el genotipo prevalente fue el homocigota 4/4, que en la población misionera alcanzó una frecuencia muy cercana a 1, con un nivel bajo de polimorfismo en esta población.

Las poblaciones analizadas no se ajustaron al equilibrio Hardy-Weinberg, suponemos que puede ser por la presencia de alelos nulos, lo cual se tendría que corroborar mediante secuenciación.

Con respecto a los valores de número efectivo de alelos para los VNTR MAO-A y IL1RN, se observó un número efectivo bajo para las dos poblaciones analizadas en comparación con el número de alelos observados, ya que solamente uno o dos alelos presentaron frecuencias mayoritarias (alelo 4 en IL1, alelos 3 y 4 en MAO-A). Este hallazgo es coincidente con lo descrito en la bibliografía para otras poblaciones del mundo (Deckert *et al.*, 1999; Arman *et al.*, 2006; Worrall *et al.*, 2007).

Los valores de heterocigosis media fueron mayores en los misioneros en comparación a los bonaerenses, para los VNTR-MAO-A y IL1RN, en cambio para los SNPs rs4680 y rs4818 el resultado fue inverso, con un valor levemente diferente entre ambas poblaciones. Esto indica una cierta diferenciación entre ambas poblaciones, aunque los valores del F_{st} no lo demuestran. De acuerdo con los valores de F_{st} y AMOVA obtenidos, la mayor cantidad de variación proviene de la heterogeneidad interna de las dos poblaciones analizadas. En consecuencia, se descarta la importancia de procesos de deriva genética, y de acuerdo al ajuste al equilibrio Hardy-Weinberg se descarta el proceso de selección, actuando sobre estos genes. El principal factor responsable de los resultados obtenidos es sin duda el proceso migratorio, con sus particularidades en cada provincia.

El presente análisis fue realizado bajo el supuesto de que existen diferencias en la composición genética de las poblaciones bonaerense y misionera, considerando esta última con un índice migratorio menor, a diferencia de la bonaerense que sufre un proceso de flujo génico mucho más elevado.

Asimismo, se esperaba encontrar frecuencias alélicas distintas de las europeas para algunos marcadores a causa de la posible influencia de comunidades autóctonas locales, principalmente en la provincia de Misiones, mientras que en la provincia de Buenos Aires, la tasa creciente de inmigrantes de países limítrofes hace esperar también un cambio en las frecuencias alélicas con respecto a las comunidades de origen europeo. Se analizaron individuos argentinos que no se autodenominan como amerindios y tienen al menos dos de sus abuelos provenientes de Europa, esperábamos encontrar un pequeño porcentaje de frecuencias no europeas; ya que dos de sus abuelos no eran europeos.

Los resultados obtenidos mostraron sin embargo una cierta similitud genética con poblaciones europeas, la cual debe ser confirmada mediante un análisis más extenso, con números muestrales mayores.

En el futuro, los tratamientos terapéuticos para aliviar el dolor requerirán conocer la dotación genética del paciente a fin de seleccionar los fármacos adecuados para un tratamiento eficaz. La información que se ha obtenido en el presente trabajo brindará un aporte a dicho conocimiento.



CONCLUSIONES

1- Los cuatro marcadores analizados resultaron polimórficos tanto en la provincia de Misiones como en la de Buenos Aires.

2- Las diferencias halladas entre ambas provincias no fueron muy marcadas; los valores de heterocigosis fueron más elevados para los misioneros en los marcadores VNTRs, mientras que para los bonaerenses, los marcadores SNPs presentaron mayor heterocigosis, lo cual sugiere la existencia de diferentes procesos migratorios ocurriendo en la actualidad en las dos provincias.

3- No se observan diferencias marcadas en relación con los datos bibliográficos para otras poblaciones del mundo, por lo cual se concluye que la contribución de comunidades amerindias locales no ha tenido un efecto importante en las frecuencias alélicas de estos marcadores.

4- Estos resultados podrán contribuir a la conformación de una base de datos para su utilización en terapias paliativas futuras.



En una segunda etapa de este trabajo se pretende:

- Aumentar el número de individuos a analizar e incorporar nuevos marcadores.
- Analizar poblaciones de origen amerindio y europeo para su comparación.
- Analizar individuos con una patología particular que incluya manifestación de dolor para realizar estudios de asociación con marcadores genéticos.



Arman A., Yilmaz B., Cocker A., Inane N., Direskeneli H. (2006) Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) and interleukin-1b gene polymorphisms in Turkish patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 24: 643-648.

Armero P., Muriel C., Santos J., Sánchez-Montero F.J., Rodríguez R.E., González-Sarmiento R. (2004) *Genetic foundations of pain*. *Rev Soc Esp Dolor*; 11: 444-451.

Avena S. A., Goicochea A. S., Rey J., Dugoujon J. M., Dejean C. B., Carnese F. R. (2006) Mezcla génica en una muestra poblacional de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina (B. Aires)*, vol.66, no.2, p.113-118.

Bataille E., Chaussed R. (1997) Bases Neurophysiologiques. *Soins* 6-8.

Bittles A. H. Neel J. Y. (1994) The costs Human inbreeding and their implications for variation at the DNA level. *Nature Genetic* 8: 117-121.

Braver T., Barch D., Cohen J. (1999) Cognition and control in schizophrenia: a computational model of dopamine and prefrontal function. *Biol Psychiatry*.46:312-28.

Breitbart W., McDonald M., Rosenfeld B., Passik S., Hewitt D., Thaler H., Portenoy R. (1996) Pain in ambulatory AIDS patients. I. Pain characteristics and medical correlates. *Pain* 68:315–21.

Brunner H.G., Nelen M., Breakefield X.O., Ropers H.H, Oost B.A (1993b) Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262:578-580.

Catanesi C.I., Di Rocco F. (2005). Presencia del alelo 2 del VNTR localizado en el gen antagonista de IL1-R en poblaciones nativas sudamericanas. 50 Reunión Anual SAIC, Mar del Plata. *Medicina (Bs. As.)* vol.65, Supl.II: 49.

Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F.(1981)Genética de las Poblaciones Humanas. *Ed. Omega*. Barcelona.

Cavalli-Sforza L.L, Menozzi P, Piazza A. (1996) The history and geography of human genes. *Princeton University Press*, Princeton, N. Jersey.

Chen Z., Hotamsligil G.S., Huang J-K., Wen L., Ezzeddine D., Aydin-Muderrisoglu N., Pwell J.F., Huang R.H., Breakefie X.O., Craig I., Hsu Y-P. P. (1991) Structure of the human gene for monoamine oxidase type A. *Nucleic Acids Reseach*, Vol. 19, No. 16 4537-4541

Cook L.M (1979) Cuadernos de biología: Genética de Poblaciones. *Ed. Omega*. Barcelona.

Coork M.J., Tarlow J.K., Blakemore A.I., McDonagh J.G., Messenger A.G., Bleehen S.S. (1997) Genetics of interleukin one receptor antagonists in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 100:552

Deckert J. ,Catalano M., Syagailo Y.V., Bosi M., Okladnova O., Di Bella D., Nöthen Markus M., Maffei P., Franke P., Fritze J., Maier W., Propping P., Beckmann H., Bellodi L., Lesch K-P.(1999) Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder.*Human Molecular Genetics* VOL.8, NO 4 621-624.

Diatchenko L., Slade G.D., Nackley A.G., Bhalang K., Sigurdsson A.,Belfer I., Golman D., Xu K., Shabalina S.A., Shagin D. (2005) Genetic basis for individual variation of

pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet* 14:135-143.

Edwards R., Fillingim R. (1999). Ethnic differences in thermal pain responses. *Psychosom Med* 61:346–54.

Erdal M.E., Herken H., Yilmaz M., Bayazit Y.A.,(2003) Monoami oxidase-A gene promoter polymorphism in female migraineurs. *Pain Cli* 15:455-458.

Erlichh H.A. Gelfand D., Sninsky J.J.(1991) Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252: 1643-1650.

Faucett J., Gordon N., Levine J.(1994) Differences in postoperative pain severity among four ethnic groups. *J Pain Symptom Manage* 9:383–9.

Fowler J.B., Macgregor R.R, Wolf A.P, Arnett C.D., Dewey S.L, Schlyer D., Christman D., Logan J., Smith M., Sachs H., Aquilonius S.M., Bjurling P., Halldin C., Hartving P., Leenders K.L., Lundqvist H., Orelund L., Stalnacke C-G., Langstrom B. (1987) Mapping human brain monamine oxidase A and B with C-labeled suicide inactivators and PET. *Science* 235:481-485.

Gibson G., Muse S.V. (Editores) (2004) A Primer of Genome Sequence. Segunda Edición. Sinauer Associates.

Grover S, Tandon S, Misra R, Aggarwal A (2006) Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis in India. *Indian J Med Res* 123:815–820

Gürsoy S., Erdal E., Sezgin M., Barlas I.O., Aydeniz A., Alasehirli B., Sahin G.(2008) Which genotype of MAO gene that the patients have are likely to be most susceptible to the symptoms of fibromyalgia?*Rheumatol Int* 28: 307-311.

Havemose-Poulsen A., Sorensen L. K., Bendtzen K., Holmstrup P. (2007) Polymorphisms within the IL-1 gene cluster: effects on cytokine profiles in peripheral

blood and whole blood cell cultures of patients with aggressive periodontitis, juvenile idiopathic arthritis, and rheumatoid arthritis. *J. Periodontology* 78: 475-492.

Hinds H.L., Hendricks R.W., Craig I.W., Chen Z. Y.(1992) Characterization of a highly polymorphic region near the first exon of the human MAO-A gene containing a GT dinucleotide and a novel VNTR motif. *Genomics* 13: 896-897.

Huang C.M., Wu M.C., Wu J.Y., Tsai F.J. (2002) Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 21:255–257.

Huang Y.Y, Cate S.P, Battistuzzi C., Oquendo M.A., Brent D., Mann J.J.(2004) An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase a gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences. *Neuropsychopharmacology*, 29(8): 1498-505.

Huerta D., Acosta O., Polo S., Martinez R., Oré R., Miranda C.(2007) Polimorfismo Val108/158Met en el gen dopaminérgico catecol-metil transferasa (COMT) en una población mixta peruana y su importancia para los estudios neuropsiquiátricos. *An Fac Med Lima* 68(4)

Hudson R.R. (1990) Gene genealogies and the coalescent process, pp1-44 en *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, editado por Futuyama y Antonovics. Oxford University Press, Nueva York, USA.

Kimura M. (1985) *The Neutral theory of molecular evolution*. Cambridge university Press, Cambridge.

Konradi C. Ozelius L., Breakefield X.O.(1992) Highly polymorphic (GT)_n repeat sequence in intron II of the Human MAOB gene. *Genomics* 12: 176-177.

Lahn B. T., Page D. C. (1999) Four Evolutionary Strata on the Human X Chromosome. *Science* 286: 964-967.

Lee Y.H., Kim H..J, Rho Y.H., Choi S.J., Ji J.D., Song G.G. (2004). Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 24:133–6.

Lewin R.(1997)Patters in Evolution: The New Molecular View. *Scientific American Library*, N. York.

Lewin B. (1998) Genes VI. *Ed. Oxford University Press*. Oxford, Inglaterra.

Lewin B. (2001) Genes VII.*Ed. Oxford University Press*. Oxford, Inglaterra.

Li, C. (1976). First course in population genetics. Boxwood, Pacific Grove, CA.

Licinio J., Wong M.L.(1999) The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological stress-responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection. *Mol Psychiatry* 4:317-327.

López Tinomneda F. (1996). Definición y Clasificación del dolor .Charlas Urológicas de la Complutense, UCM, Madrid 4. 49-5 .

Luque-Cabrera J., Herráez Sánchez A. (2002) Biología Molecular e Ingeniería Genética.*Ed. Elsevier Science*. Madrid, España.

Mannisto P, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors.*Pharmacological Reviews*. 1999;51(4):593-628.

Maulenbelt I., Seymour A.B., Nieuwland M., Huizinga T.W., van Duijn C.M., Slagboom P.E. (2004) Association of the interleukin-1 gene cluster with radiographic signs of osteoarthritis of the hip.*Arthritis Rheum* 50:1179–1186.

Mechlin M. B., Maixner W., Light K. C., Fisher J.M., Girdler S.S.(2005). African Americans Show Alterations in Endogenous Pain Regulatory Mechanisms and Reduced Pain Tolerance to Experimental Pain Procedures. *Psychosomatic Medicine* 67:948–956.

Meltzer H.(1989) Serotonergic dysfunction in depression. *Br J Psychiatr Suppl* 8: 25-31.

Mogil J.S. (1999) The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci* 96: 7744-7751.

Mogil J.S., Devor M. (2004) Introduction to pain genetics. En: *The Genetics of Pain Progress in Pain Research and Management* vol. 28 Editor: J.S. Mogil. IASP Press, Seattle, 349pp

Mullis K. (1990) Reaccion en cadena de la polimerza. *Investigacion y Ciencia*, 30-37.

Nackley A.G., Shabalina S. A., Tchivileva I.E., Satterfield K., Korchynskiy O., Makarov S.S., Maixner W., Diatchenko (2006) Human Catechol-O-Methyltransferase Haplotypes Modulate Protein Expression by Altering mRNA Secondary Structure. *Science*, VOL 314, 1930-1933.

Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, N. York.

Perrier S., Coussediere C., Dubost J.J., Albuissou E., Sauvezie B. (1998) IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 87:309–313.

Primer encuentro Interdisciplinario PROMEDOLOR (2008) “El dolor crónico oncológico y los cuidados paliativos”. Hospital Gral de Agudos “Dr.J. M. Ramos Mejia.

Prism 5 for Windows. 1992-200 GraphPad Software inc. All rights reserve.

Rahim-Williams B., Riley III J. L., Herrera D. , Campbell C. , Hastie B. A , Fillingim R.B. (2007) Ethnic Identity Predicts Experimental Pain Sensitivity In African Americans and Hispanics. *Pain* 129(1-2): 177-184.

Riley J.L., Wade J.B., Myers C.D., Sheffield D., Papas R.K., Price D.D. Racial-ethnic differences in the experience of chronic pain. *Pain*. 2002;100:291–298.

Roussos P., Giakoumaki S.G., Pavlakis S., Bitsios P. (2008) Planning, decision-making and the COMT rs4818 polymorphism in healthy males. *Neuropsychologia* 46, 757-763.

Sabol S.Z, Hu S., Hamer D. (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 103:273-279.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y.

Santila S, Savinainen K, Hume M (1998) Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1b production in vitro. *Scand J Immunol* 47:195–198.

Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000) Arlequin ver. 2.0: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Univ. Of Ginebra, Suiza.

Seldin M. F., Tian C., Shigeta R., Scherbarth H.R., Silva G., Belmont J.W., Kittles R., Gamron S., Allevi A., Palatnik S.M., Alvarellos A., Paira S., Caprarulo C., Guillerón C., Catoggio L.J., Prigione C., Berbotto G.A., García M. A., Perandones C. E., Pons-Estel B.A., Alarcon-Riquelme M. E.(2006) Argentine population genetic structure: Large variance in Amerindian contribution. *American Journal of Physical Anthropology* VOL 132 NO 3, 455 - 462

Sherwood M, Garcia-Siekavizza A, Meltzer M, Hebert A, Burns A, McGorray S. (1998) Glaucoma's impact on quality of life and its relation to clinical indicators. *Ophthalmology* 105:561-6.

Stewart W, Lipton R, Liberman J. (1996).Variation in migraine prevalence by race. *Neurology* 47:52-9.

Strickberger M. J. (1976) *Genética, Ed. Omega, Barcelona.*

Tarlow J.K., Blakemore A.I., Lennard A., Solari R., Hughes H.N., Steinkasserer a., Duff G.W.(1993)Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 91: 403-404.

Thorpe L.W., Westlund K.N., Kochersperger L.M., Abell C.W., Denney R.M. (1987) Immunocytochemical localization of monoamine oxidase A and B in human peripheral tissues and brain. *J Histochem Cytochem* 35:217-236.

Valls A. (1985) Introducción a la Antropología. Fundamentos de la evolución y la variabilidad biológica del Hombre. *Ed. Labor Universitaria, Barcelona.*

Vargas-Alarcón G., Fragoso J.M, Cruz-Robles D, Vargas A.,Vargas A., Lao-Villadóniga J.I., García-Fructuoso F., Ramos-Kuri M., Hernández F., Springall R., Bojalil R., Vallejo M., Martínez-Lavín M.(2007)Catechol-O-methyltransferase gene haplotypes in Mexican and Spanish patients with fibromyalgia *.Arthritis Research & Therapy* Vol 9 No 5,1-7.

Velez-Castrillon S., Camargo J.F., Correa P.A., Anaya J-M.(2004) Bases moleculares de la familia de a interleuquina-1.*Revista Colombiana de Reumatología* VOL11 NO. 1 11-39.

Vencovsky J., Jarosova K., Ruzickova S., Nemcova D., Niederlova J., Ozen S. (2001) Higher frequency of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 44:2387–2391

Walsh P.S., Metzgr D.A., Higuchi R.(1991) Chele 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10, 4: 506-513.

White S., Asher M., Lai S., Burton D. (1999) Patients' perceptions of overall function, pain, and appearance after primary posterior instrumentation and fusion for idiopathic scoliosis. *Spine* 16:1693-700.

Witkin S.S, Gerber S, Ledger W.J (2002) Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Inf Diseases* 34:204–209.

Wright S. (1969) Evolution and genetics of poblations. Vol 2 The Theory of Gene Frecuencias. Chicago University, Chicago.

Worrall B.B., Brott T.G., Brown Jr. R.D., Brown W.M., Rich S.S., Arepalli S., Wavrant-De Vrièze F., Duckworth J., Singleton A.B., Hardy J., Meschia J.F., e investigadores de SWISS, ISGS, y MSGD (2007) IL1RN VNTR Polymorphism in Ischemic Stroke: Analysis in 3 Populations. *Stroke*. 38(4): 1189–1196.

You C., Li J-F., Xie X-D., Zhu Y., Li P-Q, and Chen Y-R.(2007) Association of interleukin-1 genetic polymorphisms with the risk of rheumatoid arthritis in Chinese population. *Clin Chem Lab Med* 45(8):968–971.

Yu Y., Tsai S-J., Hong C-J., Chen T-J., Chen M-C., and Yang C-W. (2005). Association study of a monoamine A Gene Promotor Polymorphism with Major Depressive Disorder and Antidepressant Response. *Neuripsychopharmacology* 30, 1719-1723.

Zubieta J-K.,Heitzeg M.M.,Smith Y.R.,Bueller J.A.,Xu K.,Xu Y., Koepe R.A.,Stohler C.S.,Goldman D.(2003) COMT val158met Genotype Affects mu-Opioid Neurotransmitter Responses to a Pain Stressor. *Science* VOL 299,1240-1243.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

Biodists, S. A. de C.V.: http://biodist.com/biologia_mol.html

International Association for the Study of Pain.
<http://www.iasp-pain.org//AM/Template.cfm?Section=Home>

Paz N.M., Schlatter A.R., Letiz G., Ferrer M. (2003) Caracterización molecular de poblaciones locales de maíz. Publicación de INTA-Pergamino (Bs.As., Argentina)
Revista de Investigaciones Agropecuarias:
http://www.inta.gov.ar/pergamino/info/documentos/t_maiz/artic14.htm

Zamudio T. (2008) Derecho de los pueblos indígenas:
<http://www.indigenas.bioetica.org/nota28.htm>

Museo del Inmigrante: <http://www.mininterior.gov.ar/migraciones/museo/index.html>

Historia de la provincia de Misiones:
http://www.misionesvive.com.ar/historia_misiones.html

Gobierno de la provincia de Misiones. Historia de Misiones:
<http://www.misiones.gov.ar/historia/HistoriaContemporanea.htm>

Página 12: <http://www.pagina12.com.ar/2001/suple/No/01-07/01-07-05/NOTA1.HTM>
(Suplemento joven página de/ 12.(2001)).

Artículo en Wikipedia: la composición Étnica de la Argentina
http://es.wikipedia.org/wiki/Composici%C3%B3n_%C3%A9tnica_de_Argentina .

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
Comunidad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales del RIDUNaM
(Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI-(Grado) titulada/o
"VARIACIÓN DE LOS GENES COMT, MAO-A E IL1RN EN DOS PROVINCIAS ARGENTINAS".

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por,

DIRECCIÓN: CECILIA INÉS CATANESI

CODIRECCIÓN: LIDIA ARBELETICHE VIDAL RIOJA.

presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) 05/03/2009, Acta/Expdte. N°51063, con el fin de obtener el título de LICENCIADA EN GENÉTICA.

Tildar según corresponda

- Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Tesis de Grado

Derechos patrimoniales

Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.





En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

Condiciones de acceso en línea

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciante (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	Reconocimiento - NoComercial - CompartirIgual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Referencias:

- CC (Licencias Creative Commons).
 BY (Atribución).
 NC (No comercial).
 SA (Compartir igual).


Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	Glesmann Laura Angela
Correo electrónico	laugles@gmail.com

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas, Misiones a los 6 días del mes de MAIJO de 2026.


LAURA GLESMANN
