



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULO DE BIOQUÍMICO FARMACEUTICO

Identificación de haplotipos mitocondriales característicos en población mestiza
e indígena de la provincia de Loja – Ecuador

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Guamán Parra, Karina Alexandra

DIRECTOR: Arévalo Jaramillo, Ana Paulina, Mg.

LOJA - ECUADOR

2015

APROBACION DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mg.

Ana Paulina Arévalo Jaramillo

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado: **“Identificación de haplotipos mitocondriales característicos en población mestiza e indígena de la provincia de Loja – Ecuador”** realizado por: Guamán Parra Karina ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba para la presentación del mismo.

Loja, agosto de 2015

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Guamán Parra Karina Alexandra declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Identificación de haplotipos mitocondriales característicos en población mestiza e indígena de la provincia de Loja – Ecuador, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Paulina Arévalo Jaramillo directora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el siguiente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autor: Guamán Parra Karina Alexandra

Cédula: 1104897374

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Carlos y Rosa por todos los valores y enseñanzas que supieron inculcarme desde pequeña, por su amor, paciencia y apoyo brindado a lo largo de toda mi vida.

A mis hermanos Juan Carlos y Nathaly por ser mis amigos incondicionales y por darme sus palabras de ánimo en todo momento.

Karina Guamán

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradecer a Dios por el don de la vida, a mis padres porque gracias a ellos puedo culminar mis estudios y obtener mi profesión.

Al Doctor Antonio Torroni por guiar el rumbo de esta investigación, por compartir su invaluable conocimiento, su tiempo y dedicación.

De manera muy especial agradezco a la Mg. Ana Paulina Arévalo, por ayudarme en el desarrollo de mi tesis y así poder terminar de manera satisfactoria mi trabajo.

A la BqF. Ana Belén Córdova, por sus enseñanzas y sus comentarios siempre bienvenidos.

A mis compañeros de laboratorio en la Universidad de Pavía, Francesca, Luis, Alessandro, Sara y Asmer gracias por hacer cómoda mi estadía en Italia.

A todas mis amigos del laboratorio de Ciencias de la Salud gracias por el apoyo y tantos momentos de alegría.

A Pablo Andrés por tu apoyo incondicional en todo momento, por animarme a seguir adelante.

Y finalmente agradecer a la Universidad de Pavía, al departamento de Microbiología y Genética Humana por su aporte brindado para esta investigación y de igual manera a la Universidad Técnica Particular de Loja por la formación académica brindada.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| CERTIFICACIÓN | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS | iii |
| DEDICATORÍA | iv |
| AGRADECIMIENTO | v |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABLAS | vii |
| ABREVIATURAS | viii |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO | |
| 1.1. La mitocondria | 6 |
| 1.2. ADNmt | 7 |
| 1.2.1. Región Control o D-loop | 8 |
| 1.2.2. Herencia Materna | 9 |
| 1.3. ADNmt y la genética poblacional | 10 |
| 1.3.1. Haplotipos del ADNmt | 10 |
| 1.3.2. Historia de las rutas de migración | 10 |
| 1.3.3. Población de América | 11 |
| 1.3.4. Población Ecuatoriana | 12 |
| 1.3.5. Etnia Saraguro | 12 |
| 1.3.6. Mestizos de la provincia de Loja | 12 |
| CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO | |
| 2.1. Objetivo general del proyecto | 13 |
| 2.2. Objetivo específico del proyecto | 13 |
| CAPÍTULO III. METODOLOGÍA | |
| 3.1. Muestras | 14 |
| 3.2. Análisis Genético | 14 |
| 3.2.1. Amplificación de la región control del ADNmt | 14 |
| 3.3. Análisis de resultados | 15 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | |
| 4.1. Análisis de Haplotipos | 16 |
| 4.2. Análisis del ADNmt en población indígena | 16 |
| 4.3. Análisis del ADNmt en población mestiza | 17 |
| CONCLUSIONES | 18 |
| RECOMENDACIONES | 18 |
| BIBLIOGRAFÍA | 19 |
| ANEXOS..... | 20 |

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de la Mitocondria.
- Figura 2.** Mapa del genoma mitocondrial.
- Figura 3.** Estructura de la Región Control del ADNmt (D-loop).
- Figura 4.** Ruta de las migraciones humanas.
- Figura 5.** Modelos de difusión en las Américas.
- Figura 6.** Árbol de ADNmt.

LISTAS DE TABLAS

- Tabla 1.** Haplogrupos identificados en población mestiza e indígena

ABREVIATURAS

ADNmt: ADN mitocondrial

ATP: Adenosin trifosfato

RNA_t: RNA de transferencia

D-LOOP: Región Control del ADN mitocondrial

RESUMEN

El estudio de ADN mitocondrial de individuos de diferentes poblaciones humanas ha permitido determinar linajes mitocondriales específicos de diferentes áreas geográficas. Su característica de poseer una herencia exclusivamente materna lo ha constituido en una herramienta importante para estudios poblacionales. El presente trabajo tiene como objetivo el análisis de dichos linajes en individuos mestizos e indígenas de la provincia de Loja. En el grupo indígena se observó dos haplogrupos, el B en un 46% y el C en un 4%; mientras que en el grupo mestizo se evidenció la presencia de los haplogrupos B en un 12%, el C en un 20%, y D con 6%, se hicieron presentes también en esta población haplogrupos que no pertenecen a los grupos amerindios fundadores, como los haplogrupos L(1%), R(2%) y U(1%), lo cual indica el aporte del linaje europeo, asiático y africano en la población mestiza analizada.

Palabras Clave: Haplogrupo, Amerindio, Linaje, mitocondria.

ABSTRACT

The study of mitochondrial DNA from individuals of different human populations has identified specific mitochondrial lineages of different geographical areas. It's characteristic of having an exclusively maternally inherited and has constituted an important tool for studies of this nature. This work aims to analyze these lineages in a population of mestizos and indigenous people of the province of Loja. The indigenous group two haplogroups were observed the B 51% and C 4%, while the mestizo group in the presence of haplogroups B 13%, C was evident in 20%, and D with 4.4%, they were present also in this population haplogroups non founders Amerindian groups, such as haplogroup L (1%) R (2%) and U (1%), indicating the contribution of lineage European, Asian and African to the mestizo population.

Keywords: Haplogroup, Amerindian, Lineage, mitochondria.

INTRODUCCIÓN

Son muchos los antecedentes aportados por la arqueología, la antropología biológica y la genética de poblaciones, que sugieren que el poblamiento de América se produjo como consecuencia de un evento migracional originado en el noreste de Asia (Gibbons, 1993).

El poblamiento se habría llevado a cabo cruzando Beringia, al darse condiciones favorables de tránsito hace aproximadamente unos 35000 años atrás, siendo el número y la duración de las corrientes migratorias aún tema de debate (Torroni et al. 1993); que lleva hacer la pregunta de ¿cuándo y de dónde llegaron los primeros americanos, y que rutas migratorias siguieron?

El genoma mitocondrial, a pesar de su pequeño tamaño, ha desempeñado un papel fundamental en estudios de genética poblacional. Este se hereda por vía materna, es decir, aunque tanto hombres como mujeres tienen ADN mitocondrial (ADNmt) únicamente éstas últimas lo transmiten a su descendencia. Consta de aproximadamente 16569 pares de bases (p.b.) y contiene información de 38 genes: 2rRNA (12S y 16S), 22tRNA y 13 genes estructurales (Pakendorf, 2005).

La región mayor no codificante, conocida como región control o *D-Loop*, ocupa 1122 pares de bases, posee tres regiones hipervariables I, II y III. Estas se destacan por su elevada tasa de mutación y por ser muy variables entre las diferentes poblaciones, por lo que es la que se analiza principalmente en estudios de Antropología, Genética de Poblaciones y Medicina Forense (Schwartz, 2002).

Estudios de ADNmt en la década de 1990 identificaron los principales linajes maternos de los primeros colonos Americanos. El estudio de la división de los haplogrupos fundadores en linajes que surgieron en Estados Unidos durante y después de la llegada de los humanos, expansión, y distribuciones geográficas de estos podría proporcionar nuevas pistas sobre los procesos de colonización de las diferentes regiones del continente americano (Gandini, 2011).

A partir del análisis con enzimas de restricción se ha logrado determinar que las variantes de ADNmt obtenidas de poblaciones amerindias contemporáneas caen dentro de cuatro grupos, constituidos por linajes relacionados. Cada uno de estos grupos o haplogrupos puede ser caracterizado por un marcador de ADNmt específico, los cuales son llamados haplotipos A, B, C y D (Wallace et al. 1985, Schurr et al. 1990, Torroni et al. 1992, Wallace & Torroni 1992)

Se conoce poco sobre el origen de los primeros ecuatorianos y de la dinámica de las tempranas migraciones. No obstante, las evidencias arqueológicas halladas apuntan a que la historia de los primeros habitantes de Ecuador se remontarían hace unos 11.000 años (Dillehay, 1992).

Es necesario el conocimiento genético poblacional de Ecuador para así poder relacionar la distribución de linajes mitocondriales con la historia antigua. Con este fin, en el presente estudio se plantea conocer los haplotipos de ADNmt existentes en muestras de personas mestiza e indígenas del sur del Ecuador, y determinar su frecuencia y porcentaje en la población.

MARCO TEÓRICO

1.1. La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos celulares que miden aproximadamente de 3 a 5 micras de longitud y hasta 1 micra de diámetro. Pueden aparecer como esferas, varillas u organismos filamentosos, pero la arquitectura general es la misma Fig. 1. El número de mitocondrias por células varía dependiendo de los requisitos de energía; los tejidos con una alta capacidad para realizar funciones metabólicas aeróbicas tales como músculo esquelético o del riñón tienen un mayor número de mitocondrias (Scheffler, 2007).

Poseen dos membranas, cada una compuesta de una bicapa de fosfolípidos, pero estas son bastante distintas en aspecto y en las propiedades físico-químicas, determinando así la función bioquímica de cada membrana.

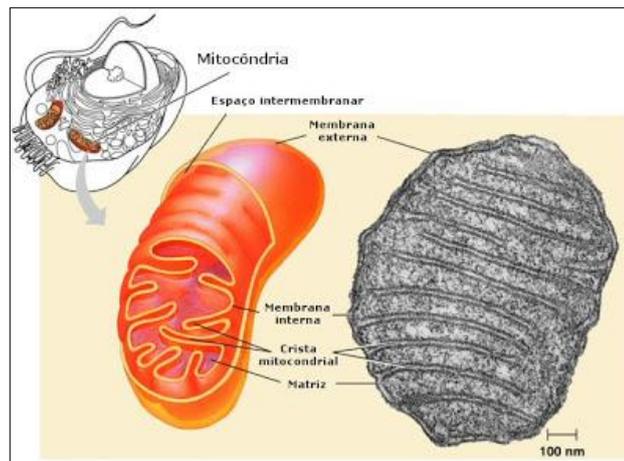


Figura 1. Estructura de la mitocondria

Fuente: Chen. (2009)

Este orgánulo está desempeñando un papel fundamental en numerosas funciones celulares tales como el metabolismo, la apoptosis y el envejecimiento, pero la producción de energía es su papel más destacado, se llama fosforilación oxidativa, y se lleva a cabo por la cadena respiratoria. Este proceso extrae energía de los nutrientes como los azúcares y grasas convirtiéndolos en el combustible universal de la célula, adenosin trifosfato (ATP) (Chinnery y Schon, 2003).

La cadena respiratoria es un grupo de cinco complejos de enzimas situado en la membrana mitocondrial interna. Cada complejo se compone de múltiples subunidades codificadas por dos genes nucleares y mitocondriales, los componentes codificados por genes nucleares se importan a la mitocondria a través de los sistemas de importación especializados (Mokranjac, 2005). Se ha sabido durante muchos años que las mitocondrias son semi - autónomas, que posee su propio genoma y la maquinaria para la replicación, transcripción, y la síntesis de proteínas (Saccone *et al.*, 2000).

1.2. ADN mitocondrial (ADNmt)

En 1981, Anderson y colegas publicaron la secuencia y organización del genoma mitocondrial humano. Este fue el primer genoma mitocondrial que había sido secuenciado completamente.

El ADNmt es una molécula circular de doble hebra que consiste en 16569 pares de bases (pb), que se encuentra en la matriz. En la región codificante, se encuentran 37 genes altamente empaquetados: 22 codifican para ARNs de transferencia, 2 para ARN ribosomales, uno 12S, otro 16S y 13 codifican para enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. (Holland, 1999). Está compuesto por dos hebras, la cadena pesada o H (Heavy) y la cadena ligera o L (Light). La cadena pesada contiene una mayor proporción de bases purínicas mientras que la ligera está compuesta mayormente por bases pirimidínicas (fig. 2).

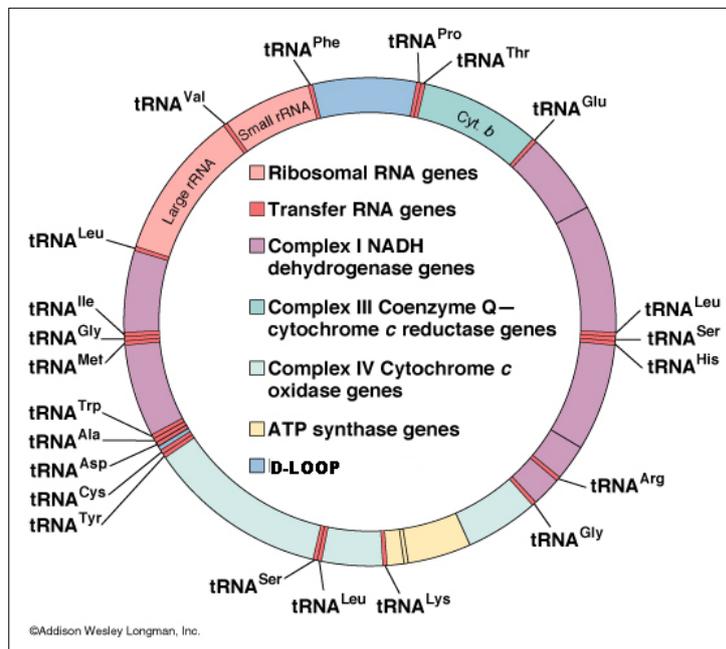


Figura 2. Mapa del genoma mitocondrial
Fuente: Wesley. (2008)

1.2.1. Región control o region d – loop

Hay varias regiones no codificantes intercaladas en la molécula, el principal es el bucle de desplazamiento ADNmt (D-bucle o de control-región) que es una región que posee 1122 p.b implicados en la regulación de la transcripción y la replicación de la molécula. La región control se extiende desde la posición del nucleótido (nt) 16.024 a nt 576 del ADNmt. Se divide en tres regiones cortas que, en comparación con el resto del genoma, tienen una secuencia altamente variable a nivel poblacional que se denominan secuencias hipervariables (HVS) HVS-I, HVS-II, y HVS-III (Brandstätter *et al.*, 2004). De las tres, la más polimórfica es la HVS-I, por lo que se la utiliza principalmente en estudios de antropología, genética de poblaciones y medicina forense (Fig. 3)

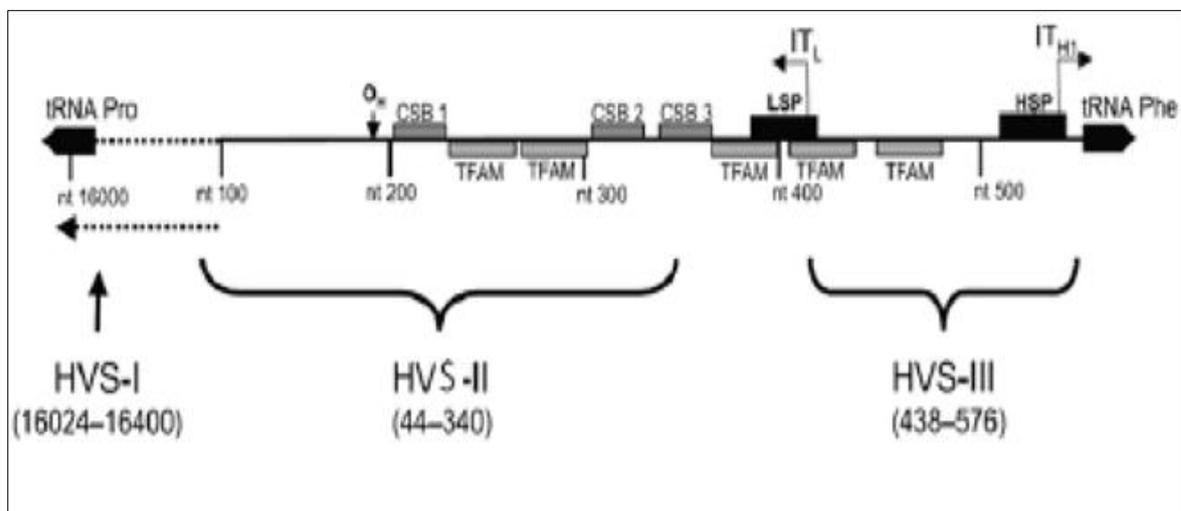


Figura 3. Estructura de la Región Control del ADNmt (D-loop)

Fuente: Brandstätter *et al.*, (2004).

La región D-Loop tiene una alta tasa de mutación, resultado en una gran cantidad de variabilidad en regiones cortas y fácilmente secuenciables, como las regiones hipervariables I y II (Salas, *et al.*, 2007). Aunque no existe acuerdo aún entre los diferentes autores para estimar la tasa de mutación, basados en comparaciones entre las secuencias de humanos y de primates, se han estimado tasas de mutación entre 1.5 y 4.95 por sitio, por millón de generaciones, basados en diferencias dentro de las poblaciones humanas. La tasa de mutación del ADN mitocondrial es más alta comparada con el genoma nuclear y se debe en parte a la exposición a radicales de oxígeno que se producen en la fosforilación oxidativa (Goodwin, 2008)

Esta característica de la región control o D-Loop permite identificar si los familiares o miembros de una población pertenecen al mismo linaje materno, lo cual depende de las secuencias de la población.

Los polimorfismos presentes en las regiones hipervariables del genoma mitocondrial se dan por transiciones o transversiones que se presentan a lo largo de la secuencia. Si bien, se pueden presentar en cualquier posición, se han detectado posiciones que mutan más frecuentemente que otras, estas son consideradas puntos calientes de mutación o “hot spots”. Se menciona que las 10 sustituciones más frecuentes son transiciones presentes en los sitios 16093, 16129, 16189, 16192, 16311, 16362, 146, 150, 152, y 195. (Salas, *et al.*, 2007).

El análisis de ADNmt se realiza en base a la comparación con una secuencia de referencia denominada secuencia de referencia de Anderson CRS o Cambridge Reference Sequence (<http://mitomap.org/MITOMAP>) la cual se conoce desde 1981 es de origen europea y se la utiliza como control para los estudios de este tipo (Anderson, *et al.*, 1981).

1.2.2. Herencia materna.

Una de las características que hace útil el estudio del DNAm en genética poblacional, es su tipo de herencia, por vía exclusivamente materna, esto quiere decir que todas las personas del mismo linaje materno tendrán, salvo pequeñas mutaciones, el mismo DNAm.

Cada individuo posee un alto número de copias de DNAm por célula, a diferencia del DNA nuclear que se encuentra en dos copias por célula en organismos diploides, un oocito maduro se estima que tiene miles de mitocondrias y más de 100000 copias de DNA mitocondrial. En células somáticas esta cantidad varía de 200 a 1700 copias de DNAm (Robin, 2007).

Entre las causas biológicas que se han mencionado para explicar este tipo de herencia, se encuentran: 1. Escasa cantidad de mitocondrias en los espermatozoides, comparadas con las miles de mitocondrias del óvulo. 2. La cabeza del espermatozoide es la que penetra el óvulo, y las mitocondrias están localizadas en el cuello. 3. Un posible mecanismo de reconocimiento que elimina las mitocondrias paternas que atraviesan la membrana del óvulo (Holland, 2000).

1.3 ADNmt y la genética poblacional.

1.3.1. Haplotipos del ADNmt.

El análisis molecular de las secuencias de ADN mitocondrial ha mostrado que la variación de las mismas se han acumulado secuencialmente a partir de algunos linajes fundadores, durante el proceso de colonización humana de las regiones geográficas, por lo cual es posible establecer grupos de secuencias que se pueden asociar geográfica o étnicamente. A partir del análisis filogenético de los linajes mitocondriales se han identificado haplogrupos que son específicos para los africanos, europeos, asiáticos y amerindios.

Los primeros estudios para el establecimiento de haplogrupos se llevaron a cabo con RFLPs (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) de alta resolución y mostraron la existencia de cuatro haplogrupos específicos Europeos denominados H, I, J, K. (Torrioni, 1993).

Torrioni muestra que existe una correlación entre los haplogrupos definidos por RFLPs y las secuencias para HVI y HVII. Empleando este tipo de análisis conjunto, el autor confirmó la presencia de los cuatro haplogrupos inicialmente definidos para Europa y se adicionaron los haplogrupos T, U, V, W y X. Los haplogrupos T, V y W resultaron asociados específicamente a un origen caucasoide; mientras que el U se comparte entre europeos y africanos, y el X se comparte entre Europeos y Amerindios del norte. También se definió el M como Asiático, y los haplogrupos L1 y L2 como Africanos. (Torrioni, 1993).

Torrioni realizó el análisis por RFLPs y secuenciación de la región control del ADN mitocondrial de 326 individuos provenientes de 17 poblaciones nativo americanas, y se mostró una correlación directa entre los cuatro haplogrupos definidos por RFLPs y la variación de secuencia de la región control. Se definen así, cuatro haplogrupos fundadores Americanos denominados A, B, C y D (Torrioni, 1993).

1.3.2 Historia de las rutas de migración.

Se ha demostrado por medio de evidencia fósil, arqueológica y de estudios genético poblacionales, que el origen de los humanos modernos tuvo lugar en África, durante la edad de piedra, lo cual se ha corroborado además porque en este continente se encuentra el mayor grado de variabilidad genética (Jorde, 2000).

La evidencia por ADN mitocondrial sugiere que existió una única dispersión humana desde África por la costa sur hacia la India y posteriormente hacia el este de Asia y Australia (Derenko, 2007).

América fue el último continente colonizado por los humanos. Se ha postulado que durante la edad de hielo, el subcontinente siberiano se agrandó en extensión hacia el noreste debido a los bajos niveles de los mares de Bering y Chukchi, lo que creó un refugio en Bering que conectó Siberia con Alaska, permitiendo así las migraciones hacia el nuevo mundo (Volodko, 2007)

A lo largo de la historia las mutaciones se han acumulado secuencialmente en los linajes de ADNmt a partir de las secuencias fundadoras. Estos linajes fueron divergiendo a medida que las poblaciones se dispersaron por los distintos continentes. (Figura 4), es porque muchos linajes mitocondriales son específicos de determinadas regiones geográficas. Estos haplotipos relacionados filogenéticamente y específicos de una determinada región geográfica se denominan haplogrupos.

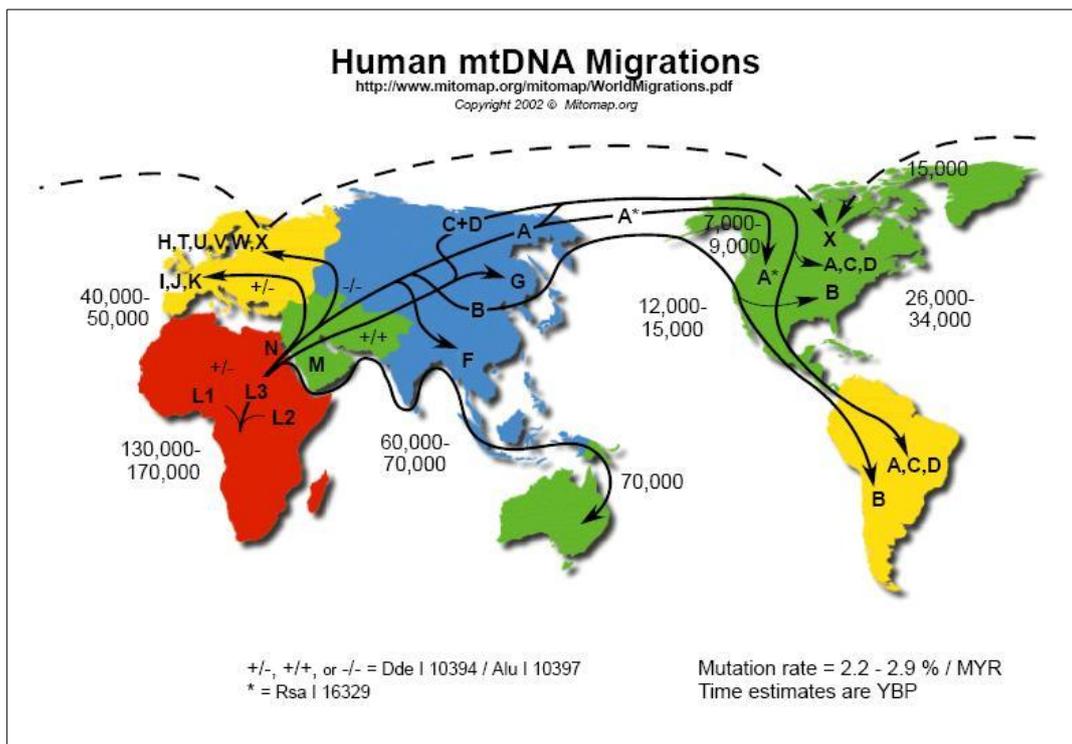


Figura 4. Migraciones humanas. Representación de la dispersión de los principales haplogrupos de ADNmt en los cinco continentes.
Fuente: Salle y Yudell. (2002)

1.3.3. Poblamiento de América

Aunque es ampliamente aceptado que los antepasados de los nativos americanos llegaron al Nuevo Mundo a través de Beringia hace aproximadamente 10 a 30 mil años, el número de eventos de expansión y las rutas de migración en las Américas siguen siendo controvertidas debido a la evidencia lingüística, arqueológica y genética existente a lo largo del continente (Perego *et al.*, 2009).

Hasta la fecha, dos hipótesis parecen las más plausibles:

Modelo Corredor-Free Ice, esta primera hipótesis sostiene que la expansión se produjo a lo largo de una ruta interna y afirma que los primeros habitantes del continente fueron los "Clovis" este nombre se refiere a una cultura Paleo - indio que aparece por primera vez en los registros arqueológicos de América del Norte hace aproximadamente 13.000 años, hacia el final del último máximo glacial (LGM). Se caracteriza por el desarrollo y el uso generalizado de una herramienta de piedra con un punto acanalado en forma de distintivo conocido como el punto de Clovis, que se adaptan particularmente para la caza de grandes mamíferos. Los partidarios de este modelo consideran que los primeros habitantes del Nuevo Mundo y los ancestros de todas las culturas indígenas de las Américas pertenecen a este grupo, sin embargo, esta visión ha sido cuestionada en los últimos treinta años por varios descubrimientos arqueológicos anteriores a la cultura Clovis, tanto en América del Norte y del Sur. Sitios Clovis se han identificado en muchas partes de los Estados Unidos, México, América Central y el norte de América del Sur (Pearson, 2005).

Modelo de "*pre-Clovis*"

La segunda teoría, formulada por Fladmark en 1979, propone un modelo alternativo al afirmar que durante el LGM la costa del Pacífico de América del Norte fue al menos en parte libre de hielo y mucho más extendida que lo que es ahora, gracias a los niveles bajos del mar, por lo tanto, las poblaciones humanas que primero llegaron a América del Norte después de cruzar Beringia se habrían movido hacia el sur a lo largo de la costa del Pacífico hace aproximadamente 1.000 años a través de una combinación de caminata y rafting costera mediante dispositivos flotantes simples (Fix, 2005; Fladmark, 1979)



Figura 5. Modelos de difusión en las Américas.
 En verde: modelo de Corredor-Ice con el paso por el corredor libre de hielo.
 En rojo: el modelo de expansión a lo largo de la costa del Pacífico
Fuente: Fladmark (1979)

1.3.4. Población ecuatoriana

Se conoce poco sobre el origen de los primeros ecuatorianos y de la dinámica de las tempranas migraciones. No obstante, las evidencias arqueológicas halladas apuntan a que la historia de los primeros habitantes de Ecuador se remontarían hace unos 11.000 años (Dillehay, 1992). Las investigaciones sugieren que el país se pobló por el callejón interandino, cuando los últimos glaciares estaban en pleno retroceso. Esta región, cubierta de bosques, ofrecía múltiples recursos para los recién llegados, que pudieron desarrollar actividades de caza y recolección. Es posible que estos grupos hicieran pequeñas incursiones hacia otras regiones del territorio ecuatoriano (Dillehay, 1999). Los vestigios muestran una escasa ocupación de la costa ecuatoriana, a excepción de la península de Santa Elena, donde por esta época habitaban pequeños grupos de cazadores recolectores de la cultura las Vegas (Stoother et al, 2003). En cuanto al asentamiento de poblaciones en la amazonia hay pocas evidencias al respecto, a falta de exploraciones sistemáticas de la región.

Ecuador está ubicado en la parte noroeste de América del Sur, limita al norte con Colombia, al sur y al este con Perú y al oeste con el océano pacífico. La extensión del país es de 256.370 kilómetros cuadrados. Está dividido en cuatro regiones, Costa, Sierra, Insular y Oriente o Amazonia, en las que se distribuyen 24 provincias. Ecuador está considerando como uno de los 17 países donde está concentrada la mayor biodiversidad del planeta. Según el último censo de población del 2010 (INEC, 2010) la población ecuatoriana supera los 14 millones de individuos.

La población ecuatoriana se caracteriza por ser étnicamente muy diversa, se distinguen tres grupos principales: a) mestizos (71,9%), b) amerindios nativos, con una gran variedad de grupos étnicos (7%) y c) afroecuatorianos o afrodescendientes (7.2%). También destaca la presencia de población caucásica, que representa un 6.1% de la población (INEC, 2010).

Desde un sentido etnogeográfico, Ecuador presentaría similitudes con otros países andinos (Bolivia, Perú, o norte de Chile), que poseen también un importante componente amerindio nativo (Gonzales, 2006). Este grupo se distinguiría de otros países sudamericanos como Argentina, Chile, Uruguay o Paraguay, con una contribución europea muy elevada, o de Brasil con un fuerte aporte afroamericano.

1.3.5. Etnia Saraguro

Hacia el norte de la ciudad de Loja se encuentra en asentamiento el asentamiento natural del pueblo Saraguro uno de los centros indígenas más importantes de América del sur se estima que abarca una población de 37000 habitantes (INEC 2010). Este pueblo aún conserva sus costumbres arcaicas como su idioma y vestimenta, sus atuendos son de permanente luto, recuerdan la fatídica llegada de los conquistadores que mancillaron sus tierras, sus costumbres y su honra, sellando con la muerte de Atahualpa, la muerte de una raza. Este espacio anteriormente fue ocupado por los Paltas quienes fueron desplazados por los Incas, resumidamente se cree que Tupak Yupanki conquistó a esta bella región, erradicando y sustituyendo a los Paltas por una de sus tribus del altiplano, se cree que llegaron desde Bolivia basándose fundamentalmente en las similitudes en la vestimenta con los Paquizhapas, Indígenas de la zona Boliviana de Urdaneta (Paqui, 2012).

1.3.6. Mestizos de la provincia de Loja

La población mestiza se dio por el encuentro biológico y cultural de etnias diferentes (indígenas y europeos), en el que estas se mezclan, dando como nacimiento a nuevas etnias y fenotipos. Según datos de Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) en Ecuador existe un 71.9% de población mestiza según el último censo realizado en el año 2010, para este censo cada persona se auto identificó según sus tradiciones y costumbres.

La población de Loja se caracteriza porque existe un predominio de la población mestiza (92,8%).

FIN DEL PROYECTO

2.1. Objetivo General

- Describir la variación observada en las frecuencias de haplotipos para ADN mitocondrial (ADNmt) en personas indígena y mestizas de Loja.

2.2. Objetivo Específico

- Aportar con información a las investigaciones de genética poblacional en el continente Americano.

METODOLOGÍA

3.1 Muestras

Este trabajo es un estudio observacional. Las muestras analizadas forman parte del banco de ADN del laboratorio del Departamento de ciencias la salud de la UTPL. Se evaluó un total de 90 muestras, cuya concentración fue de ~50 ng/ul.

3.2 Análisis genético

Se utilizó la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región D-loop, los primers usados fueron los siguientes: F: 5'- aaaccggagatgaaaacctt- 3' R: 5'- tggcagagatgtgtttaagtgc 3'

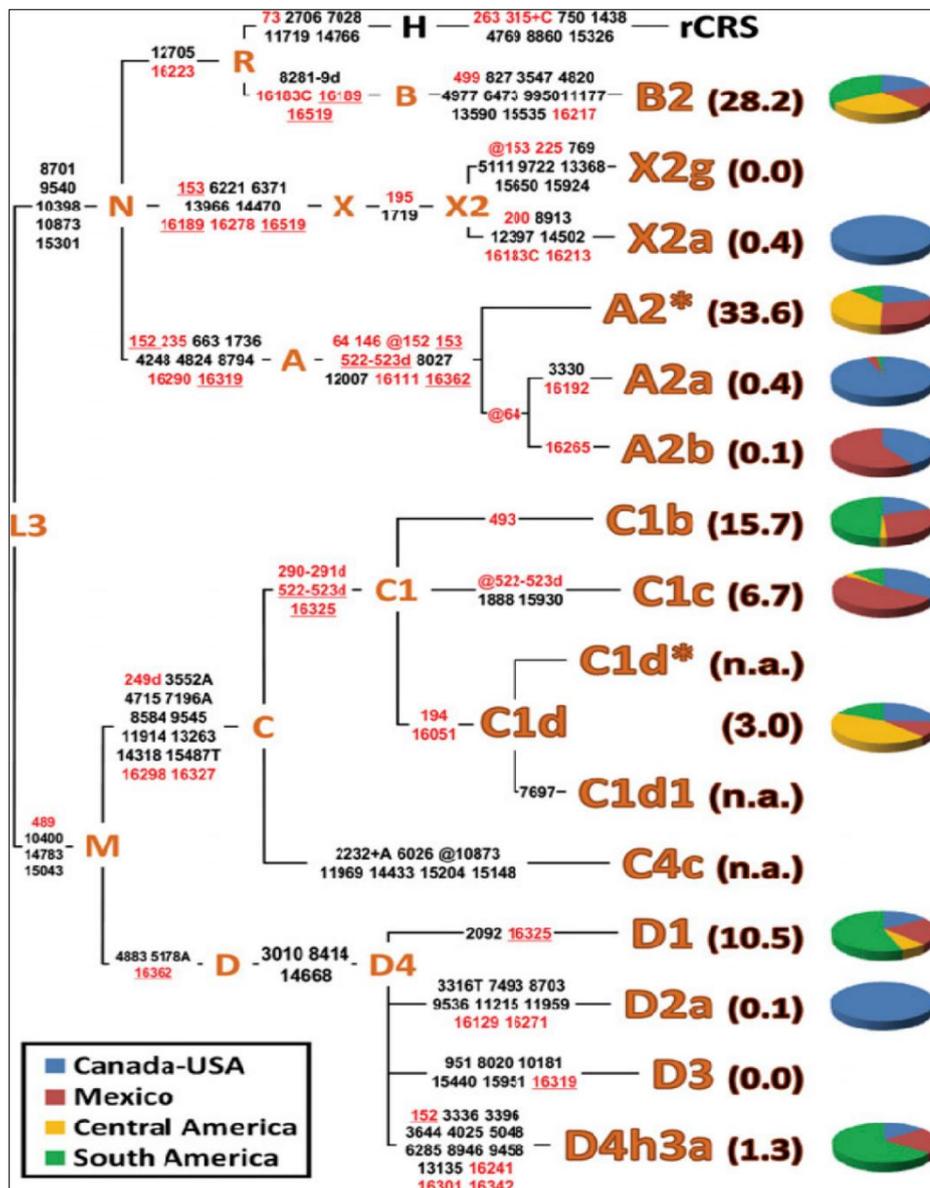
Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos que consistieron en desnaturalización a 95° C durante 30 segundos, anillamiento a 55° C por 30 segundos, extensión a 72° C durante 70 segundos y la extensión final a 72° C por 10 minutos. El equipo que se utilizó fue un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems)

Las amplificaciones fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio en condiciones de 100 voltios durante 60 minutos, posteriormente los fragmentos fueron purificados por incubación a 37 ° C durante 15 minutos usando la enzima EXOfastap (sistema ExoSAP ®) con el fin de degradar cada molécula de cadena sencilla presente en la solución. Finalmente la secuenciación se llevó a cabo por BMR Genómica SRL (<http://www.bmr-genomics.it/>), un spin-off oficial de la Universidad de Padova, que empleó un secuenciador ABI 3730 de 96 capilares, basado en el método Sanger.

Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa Sequencher™ 4.10.1 (Gene Codes).

3.3. Análisis de Resultados

Los haplogrupos fueron definidos de acuerdo a la clasificación del Árbol de ADNmt establecido por Perego en el 2010 el cual abarca las raíces de todos los haplogrupos nativos americanos conocidos. Los motivos de mutaciones distintivas de los 15 haplogrupos nativos americanos conocidos se registran en las ramas. Las mutaciones en la región control están en rojo, mientras que las mutaciones en la región codificante se muestran en negro. El prefijo @ designa reversiones, mientras que los sufijos indican transversiones (a A, G, C o T). Para la presentación de los resultados se emplean tablas que muestran frecuencias y porcentajes.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de haplogrupos

Se realizó el análisis de la región control del ADNmt con un total de 90 muestras, 40 corresponden a individuos de población mestiza y 50 individuos de población indígena los cuales pertenecen a la etnia Saraguro. Esta clasificación se la realizó considerando la autoidentificación de cada individuo.

En la tabla 1 se muestran los haplogrupos encontrados, expresados como porcentaje % (n), donde se evidenció la presencia de los haplogrupos fundadores americanos, pero también se observó la presencia de otros haplogrupos en la población mestiza como el africano, el europeo y el asiático.

Tabla 1. Haplogrupos identificados en población mestiza e indígena

| POBLACION | HAPLOGRUPOS | | | | | |
|-----------------|-------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | B | C | D | U | R | L |
| Mestiza | 13% (12) | 20%(18) | 6%(6) | 1%(1) | 2%(2) | 1%(1) |
| Indígena | 51%(46) | 4.4%(4) | | | | |

Fuente: Autor

Los resultados obtenidos concuerdan con la historia del poblamiento Americano, autores como Torroni, Bonato y Salzano y Schurr indican que la población nativa americana se clasifica dentro de los haplogrupos A, B, C, D (Torroni, 1993). Estos haplogrupos son observados en poblaciones del norte, centro y sur de América, esta distribución geográfica sugiere que todos ellos estuvieron presentes en el asentamiento original de América y que hubo una posterior diferenciación genética en las distintas regiones.

En estudios realizados a nivel de Sudamérica se ha reportado el haplogrupo B y C con una frecuencia de 41% y 37% respectivamente, en población Colombiana (Díaz, 2010). Es evidente que la frecuencia del haplogrupo B va disminuyendo de norte a sur, ya que en población chilena este presenta una frecuencia del 12%, presentándose el haplogrupo C en un 64%, en su gran mayoría en población mestiza (Rocco, 2002). Como se aprecia el haplogrupo A sería restringido solo para América del norte, y ya no es usual encontrarlo al sur del continente (Brown et al 2007).

3.2 Análisis del ADNmt en población indígena

En esta población se encontró la presencia de dos haplogrupos el más abundante fue el B con 51 % (46 individuos) y el haplogrupo C se halló en un 4,4% (4 individuos). Son de gran interés estos resultados, ya que no se evidencia la presencia de haplogrupos europeos lo que puede explicarse por el aislamiento cultural de esta etnia lo cual habría dificultado el aporte genético foráneo.

Si bien los cuatro haplogrupos A, B, C Y D normalmente aparecen juntos en las poblaciones nativas americanas algunas tribus carecen de al menos uno de esos haplogrupos, tal como sucede en determinadas poblaciones del centro de América en las que predominan los haplogrupos A y B (Salzano, 2002; Torroni *et al.*, 1994).

Estos patrones podrían reflejar la influencia de la deriva genética y del efecto fundador en la distribución de los haplotipos de ADNmt en las poblaciones americanas, causando su fijación o extinción estocástica (Kolman *et al.*, 1995; Torroni *et al.*, 1993; Schurr *et al.*, 1990). Dicho de otro modo lo que habría ocurrido es que cuando un pequeño grupo se separaba y aislaba del grupo fundador puede que no tuviera todos los haplogrupos presentes en la población original. Además debido a su menor tamaño poblacional, estos grupos serían más sensibles al efecto de las mutaciones. Esto explicaría las posibles diferencias en los porcentajes de los polimorfismos entre el grupo fundador y el derivado (Schurr, 2002). Esta explicación estaría respaldada por la alta frecuencia de algunos haplotipos particulares (variantes genéticas únicas exclusivas de pequeños grupos aislados) en varias tribus amerindias (Schurr, *et al.*, 1990). Por lo tanto el aislamiento tribal y el efecto fundador podría conducir a una divergencia genética tribal, causando la diferente distribución de haplotipos entre poblaciones.

Aunque se debe mencionar también que por otro lado las guerras y las epidemias que se produjeron causaron la muerte de un elevado número de amerindios y en algunos casos, la desaparición de pueblos enteros, con la consecuente reducción de la diversidad genética de estas poblaciones.

3.3. Análisis del ADNmt en población mestiza

En este grupo se encontró la presencia de diferentes haplotipos, el grupo B con un 13%, el C con un 20% el grupo de D con 6%, el grupo R con un 2% y el haplogrupo L y U con 1% respectivamente, lo que muestra una gran diversidad genética.

La presencia de estos linajes eurasiáticos (R, U) y africano (L) en la población mestiza está ligado al periodo clave en la historia de las poblaciones nativas americanas, que fue la llegada de los europeos al nuevo mundo, así como personas de África que eran utilizados

como esclavos, que tuvo un impacto muy profundo en el acervo genético de dichos grupos poblacionales. Por otro lado esta época se caracterizó por el mestizaje poblacional entre grupos de origen amerindio, europeo y africano. Aunque en el acervo genético mitocondrial la introducción de linajes de origen europeo y africano tuvo un impacto menor que en el caso del cromosoma Y, este también dejó una huella importante por lo que se ha podido identificar la coexistencia de haplotipos de ADNmt amerindios europeos y africanos en varias poblaciones (Mendez y Simoes, 2009).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la existencia de una importante heterogeneidad genética entre los grupos étnicos estudiados. Pero es necesario tener en cuenta que, como se ha podido ver, no siempre la ancestralidad basada en la autodefinición de la etnicidad concuerda con la ancestralidad genética. Ver Anexo 1. Así, individuos que se han autodefinido como mestizos han presentado linaje mitocondrial de origen amerindio exclusivamente, cuando sería esperable además una contribución genética europea. Esto puede tener importantes repercusiones a la hora de generar bases de datos, pues se incluirán dentro de un mismo grupo poblacional individuos con origen étnico distinto. Es necesario recordar que a pesar de la aparente homogeneidad que pueden presentar las poblaciones latinoamericanas desde una perspectiva cultural, lingüística o incluso fenotípica, a nivel genético puede existir una gran diversidad que debe tenerse en cuenta.

CONCLUSIONES

- El estudio de ADNmt en este trabajo ha demostrado una heterogeneidad genética dentro de la población analizada, las diferencias en los grupos estudiados pueden correlacionarse con los diferentes sucesos históricos y demográficos acontecidos en estas poblaciones.
- La población mestiza es la población más heterogénea genéticamente. Se identificaron haplogrupos amerindios B, C, y D pero también haplogrupos euroasiáticos R, U y africanos L. Su acervo genético es el reflejo de la compleja historia de este grupo, que se inició a raíz de la llegada de los europeos al continente americano.
- La población indígena analizada presentó los haplogrupos B y C haplogrupos fundadores. Esta relativa baja diversidad podría explicarse considerando las costumbres ancestrales de este grupo étnico.

RECOMENDACIONES

- Debido al alto grado de polimorfismo de la región control del ADN mitocondrial, encontradas en las muestras analizadas, es necesario construir bases de datos con mayor tamaño muestral, por lo cual se recomienda aumentar el número de muestras secuenciadas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Alvarez J. C. Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic DNAmT data set. En: Legal Medicine. 2007. vol 9. p. 293–304
2. Brandstätter A, Peterson CT, Irwin JA, Mpoke S, Koech DK, Parson W, Parsons TJ. (2004) Mitochondrial DNA control-region sequences from Nairobi (Kenya): inferring phylogenetic parameters for the establishment of a forensic database. Int J Legal Med 118: 294306.
3. Brown, M. D., Hosseini, S. H., Torroni, A., Bandelt, H. J., Allen, J. C., Schurr, T. G., Scozzaru, R., Cruciani, F. y Wallace, D. C (1998), mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? Am J Hum Genet 63, 1852-61
4. Chinnery PF, Schon EA. (2003) Mitochondria. J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:11881199.
5. Derenko Miroslava et al. Phylogeographic Analysis of Mitochondrial DNA in Northern Asian Populations. En the American Journal of Human Genetics. 2007. vol 81. p.1025-1041
6. Dillehay, T. D., Calderon, G. A y Politis., G. (1992). Earliest hunters and gatherers of South America. Journal of World Prehistory 6, 145-204.
8. Goodwin, W. et al. An introduction to Forensic Genetics. UK. John Wiley and Sons. 2007. p. 138
9. Holland M. et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War En: J Forensic Sci. 1993 May. vol 38(3) p. 542-53
10. Holland, M.M, y PARSONS, T.J. Mitochondrial DNA Sequence analysis – Validation and use for forensic casework. En: Forensic Science Review.1999. vol 11 No. 1
11. INEC (2010). Instituto de Estadística y Censos Ecuador. <http://www.inec.gov.ec/home/>
12. ISOGG. International Society of Genetic Genealogy. <http://www.isogg.org/tree/index08.html>
13. Jorde L. B. The Distribution of Human Genetic Diversity: A Comparison of Mitochondrial, Autosomal, and Y-Chromosome Data En: Am. J. Hum. Genet. 2000. vol 66. p. 979–988
14. Kolman C. J., Sambuughin, N y Bermingham, E. (1996). Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders, Genetics 142, 1321-34.

15. Mendes-Junior, C. T y Simoes, A. L (2009). Mitochondrial DNA variability among eight Tikuna villages: Evidence for an intratribal genetic heterogeneity pattern. *Am J Phys Anthropol* 140(3): 526-31
16. Mokranjac D, Neupert W. (2005) Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans* 33: 1019-1023. Saccone C, Gissi C, Lanave C, Larizza A, Pesole G, Reyes A. (2000). Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene* 261: 153-159.
17. Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Kashani BH, Ritchie KH, Scozzari R, Kong QP, Myres NM, Salas A, Semino O, Bandelt HJ, Woodward SR, Torroni A. (2009) Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare DNAMt haplogroups. *Curr Biol* 19: 1-8.
18. Pleistocene 22: 28-31 Fix AG. (2005) Rapid deployment of the five founding Amerind DNAMt haplogroups via coastal and riverine colonization. *Am J Phys Anthropol* 128: 430-436.
19. Pearson G, Ream J. (2005) Clovis on the Caribbean coast of Venezuela. *Curr Res Pleistocene* 22: 28-31 Fix AG. (2005) Rapid deployment of the five founding Amerind DNAMt haplogroups via coastal and riverine colonization. *Am J Phys Anthropol* 128: 430-436.
20. Robin E.D, y Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *En: J Cell Phys.* 1988. vol 136. p. 507
21. Salas A. et al. Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics *En: Forensic Science International* 2007. vol 168. p. 1–13
22. Salzano F. M (2002). Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc* 74, 223-63
23. Scheffler I. Mitochondria. New York. Wiley-Liss, 2007. p 19.
24. Stother K, E., Piperno, D. R y Andrés, T, C (2003). Terminal Pleistocene/Early Holocene human adaptation in coastal Ecuador: the Vegas evidence. *Quat Int* 109-110, 23-43
25. Schurr, T. G. (2004). The peopling of the new world: Perspectives from Molecular Anthropology. *Annu Rev Anthropol*, 33, 551-583
26. Torroni A, DNAMt Analysis Reveals a Major Late Paleolithic Population Expansion from Southwestern to Northeastern Europe. *En: Am. J.Hum. Genet.* 1998. vol. 62 p. 1137–1152
27. Torroni A., Chen, Y. S., Semino, O., Santachiara-Beneceretti, A. S., Scott, C. R., Lott, M. T., Winter, M. y Wallace, D.C, (1994). mtDNA and Y- chromosome polymorphisms in four Native American populations from southern Mexico, *Am J Hum Genet* 54, 303-18.
28. Torroni A, Lott, M. T. Cabell, M. F., Chen, Y. S., Lvergne, L. y Wallace, D. C (1994). mtDNA and the origin of Caucasians: Identification of ancient Caucasian-specific

haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am J Hum Genet* 55, 760-76.

29. Volodko, Natalia. et al. Mitochondrial Genome Diversity in Arctic Siberians, with Particular Reference to the Evolutionary History of Beringia and Pleistocenic Peopling of the Americas. En: *The American Journal of Human Genetics* 2008. vol.82. p. 1084–1100.

ANEXOS

ANEXO 1. HAPLOGRUPOS ENCONTRADOS DE ACUERDO AL GRUPO ÉTNICO

| Muestra | Grupo Étnico | Haplogrupo Encontrado |
|---------|--------------|-----------------------|
| 44 | Indígena | B |
| 34 | Indígena | B |
| 47 | Indígena | B |
| 61 | Indígena | B |
| 910 | Mestizo | B |
| 396 | Mestizo | B |
| 399 | Mestizo | B |
| 40 | Indígena | B |
| 63 | Indígena | B |
| 69 | Indígena | B |
| 78 | Indígena | B |
| 82 | Indígena | B |
| 87 | Indígena | B |
| 88 | Indígena | C |
| 118 | Mestizo | B |
| 125 | Mestizo | B |
| 126 | Mestizo | C |
| 147 | Mestizo | B |
| 149 | Mestizo | B |
| 153 | Mestizo | B |
| 159 | Mestizo | B |
| 161 | Indígena | C |
| 167 | Indígena | C |
| 171 | Indígena | C |
| 177 | mestizo | B |
| 178 | Indígena | C |
| 187 | Indígena | C |
| 201 | Indígena | B |
| 224 | Mestizo | B |
| 226 | Mestizo | B |
| 267 | Mestizo | B |
| 271 | Mestizo | B |
| 293 | Mestizo | B |
| 294 | Mestizo | B |
| 299 | Mestizo | B |
| 301 | Mestizo | B |
| 302 | Mestizo | B |
| 309 | Mestizo | B |
| 323 | Mestizo | B |
| 325 | Mestizo | B |

| Muestra | Grupo étnico | Haplogrupo Encontrado |
|----------------|---------------------|------------------------------|
| 327 | Indígena | C |
| 330 | mestizo | B |
| 897 | Indígena | B |
| 29 | Indígena | B |
| 922 | Indígena | B |
| 405 | Indígena | B |
| 415 | Indígena | B |
| 409 | Indígena | D |
| 913 | Indígena | A |
| 983 | Indígena | D |
| 418 | Indígena | C |
| 903 | Indígena | D |
| 895 | mestizo | B |
| 957 | Indígena | C |
| 1010 | Indígena | C |
| 45 | Indígena | B |
| 908 | mestizo | B |
| 54 | Indígena | B |
| 410 | Indígena | B |
| 921 | Indígena | B |
| 916 | Indígena | R |
| 901 | Indígena | B |
| 915 | Indígena | B |
| 923 | mestizo | B |
| 925 | Indígena | B |
| 928 | Indígena | C |
| 934 | Mestizo | B |
| 894 | Indígena | D |