

FRECUENCIA GENOTÍPICA PARA LA PRESENCIA DE TPA-25 EN UNA POBLACIÓN DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS DE LIMA-PERÚ

Paola M.Casas, Amparo I. Zavaleta, Héctor C. Cataño

Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue el de estudiar la frecuencia genotípica para la presencia de la inserción Alu TPA-25 en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular (TPA), en una población de 50 estudiantes universitarios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Para determinar la presencia de TPA-25, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con cebadores específicos para la inserción Alu. Las frecuencias genotípicas fueron determinadas por conteo de la presencia o ausencia de la inserción Alu, y luego, evaluadas a través de la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para conocer si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias genotípicas para la presencia de TPA-25 estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1.366$, $p = 0.505$) y fueron: homocigoto presencia de inserción Alu TPA-25 = 0.108, heterocigoto TPA-25 = 0.568 y homocigoto ausencia de inserción Alu TPA-25 = 0.324. En conclusión, en la población estudiada existe un predominio de los heterocigotos sobre los homocigotos.

Palabras clave: TPA-25, inserciones Alu, SINE, genética de poblaciones.

SUMMARY

The main objective of this study was to evaluate the genotype frequency for the presence of the Alu TPA-25 insertion in the 8 intron of the tissue plasminogen activator gene (TPA) in a population of 50 students belonging to the Faculty of Pharmacy and Biochemistry from the Universidad Nacional Mayor de San Marcos. It was used the Polymerase Chain Reaction (PCR) in order to amplify the region containing the Alu insertion and to determine the presence of TPA-25. The genotype frequency was determined by count of the presence or absence of the Alu insertion and then, evaluated across the test of Chi-square (χ^2) to know if they were in Hardy-Weinberg's balance. The genotype frequency for the presence of TPA-25 was in Hardy-Weinberg's balance ($\chi^2 = 1.366$, $p = 0.505$): homocigote 0.108, heterocigote 0.568 and homocigote absence 0.324. In conclusion, in the studied population exists a predominance of the heterocigote TPA-25 over the homocigote TPA-25.

Key words: TPA-25, Alu insertions, SINE, population genetics.

INTRODUCCIÓN

Se describe que la diversidad genética humana es el resultado de la acumulación diferencial de mutaciones presentes en individuos y poblaciones. La determinación de estas características distintivas en el ADN representa la base para la identificación humana y genética de poblaciones. A nivel molecular, una de las primeras iniciativas de clasificar a individuos y poblaciones fueron los estudios de grupos sanguíneos. Actualmente, los polimorfismos de los fragmentos de restricción [RFLPs], regiones hipervariable minisatélite (1) y

los antígenos humanos de leucocitos (2) constituyen las tres estrategias más utilizadas para la identificación de estas características distintivas, cuyas aplicaciones son la diferenciación individual, evaluación de la paternidad y la relación geográfica que puede incluir estudios de estructura poblacional, migración y evolución (3).

Las inserciones Alu son las principales representantes de los Elementos Nucleares Dispersos Cortos (SINE) (4), con secuencias de aproximadamente 300 pb presentes en 500 000 copias por genoma haploide. Se afirma que los Alu surgieron

hace, aproximadamente, 65 millones de años limitando su presencia a primates (5). El nombre deriva de un patrón de reconocimiento de una enzima de restricción llamada *Alu* I (6). Estas inserciones son potencialmente útiles en estudios de poblaciones humanas (7).

Los elementos *Alu* usados en estudios de poblaciones se han descrito en los genes que sintetizan las siguientes proteínas: APO, PV92, TPA25, FXIIB, D1, ACE, A25 y B658. La inserción *Alu* TPA-25 se encuentra distribuida de manera homogénea en las diferentes poblaciones; puede estar presente o ausente en el intrón 8 del gen del activador del plasminógeno tisular (9).

En la mayoría de poblaciones se encuentran los genotipos homocigotos TPA-25 presencia, heterocigoto TPA-25 y homocigoto ausencia TPA-25 (Fig.2), tan sólo varían las frecuencias; por lo que es utilizado como marcador genético para estudios poblacionales, ya que la frecuencia de estos genotipos variara de acuerdo al origen de la población. En el presente estudio, se usó la PCR para detectar la presencia o ausencia de TPA-25.

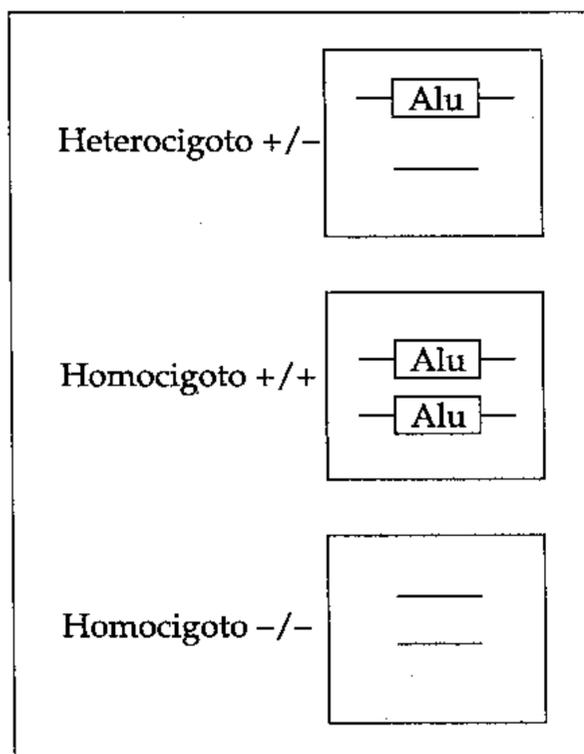


Figura N.º 2. Genotipos TPA-25.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población

Participaron cincuenta estudiantes universitarios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la

Universidad Nacional Mayor de San Marcos nacidos y habitantes de las zonas urbanas de Lima; Cuyas edades estuvieron en el rango de 19 a 25 años. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado.

Muestra

A cada participante se le extrajo 5 mL de sangre por venipunción utilizando tubos vacutainer con anticouagulante EDTA.

Detección de la presencia TPA-25

El ADN genómico se extrajo de los leucocitos de la sangre mediante el método fenol-cloroformo. Para determinar la presencia o ausencia de la inserción *Alu*, se utilizó el Kit de PCR cromosoma 8 (Biorad, USA). El volumen final de reacción fue 20 μ l y contiene: ADN genómico 100 ng, buffer de reacción (Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, dNTP 20 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, cebadores 20 μ M, *Taq* ADN polimerasa 2.5U) 10 μ l. Las condiciones de PCR se repitieron por 35 ciclos y fueron: desnaturalización a 94 °C por 0.45 min, hibridación a 64 °C por 0.45 min y polimerización 0.45 min a 72 °C. Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en buffer TAE 1X y luego visualizados con bromuro de etidio en el transiluminador UV.

Resultados

Esta es la primera estimación de la frecuencia genotípica de la inserción *Alu* TPA-25 en una población urbana de Lima. En las condiciones empleadas, para la presencia de la inserción *Alu* en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular; el producto obtenido es 960 pb y para la ausencia TPA-25 es 660 pb (Fig. 3). Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.324, 0.568, 0.108 para homocigoto TPA-25, heterocigoto TPA-25 y homocigoto ausencia TPA-25, respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron $p(+)$ = 0.569 y $q(+)$ = 0.431. Las frecuencias genotípicas para la presencia de TPA-25 estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($X = 1.366$, $p = 0.505$). La población estudiada presenta un predominio de los heterocigotos sobre los homocigotos.

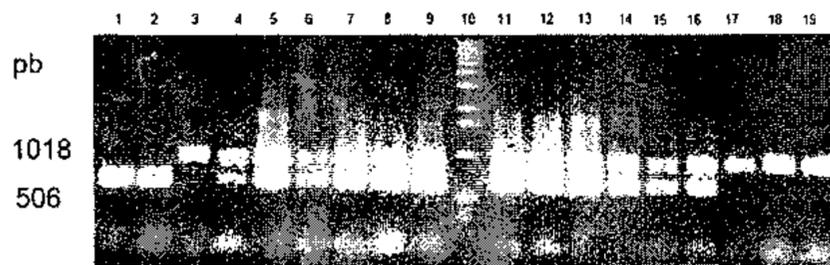


Figura N.º 3. Análisis del TPA25. Líneas 1y 2, homocigoto ausencia; 3, 17-19 homocigoto presencia TPA25; 4-15 heterocigoto TPA25.

Discusión

Comparando la frecuencia alélica presencia de TPA-25 de 0.569 obtenida de la población limeña en estudio con la de otras poblaciones (10) (Tabla N.º 1); se observa una similitud con la frecuencia alélica TPA-25 de la población europea-americana, mientras que existe una diferencia acentuada con otras poblaciones como la Africana-americana y la población Afro-Caribeña. Sin embargo, presenta mayor distancia con las poblaciones nativas de Groelandia, Alaska y de la población pigmea (grupos humanos cazadores-recolectores que habitan principalmente en África Central; presentan una talla menor de 1.50 m).

Tabla N.º 1. Distribución de TPA-25 en diversas poblaciones.

Población	N	Frecuencia de <i>Alu</i> TPA-25
Europea-Americanos*	45	0.556
Africanos-Americanos*	43	0.302
Afro-caribeños*	42	0.286
Pigmeos*34	0.221	
Nativos de Alaska*	42	0.298
Nativos de Groenlandia*	42	0.333
Población estudiada	50	0.569

*Datos obtenidos de Batzer y col (10).

La similitud de las frecuencias para la presencia de TPA-25 de la población en estudio y la europea-americana puede reflejar la fuerte contribución del componente genético caucásico (europea) resultado de la mezcla étnica que ambas poblaciones

tuvieron varios siglos atrás. Como la mezcla de amerindios, mestizos y europeos (españoles).

Se concluye que en la población estudiada existe un predominio de los heterocigotos TPA-25 sobre los homocigotos para TPA-25.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein, SL. 1985; Hypervariable "Minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314:67-72.
2. Dausset J. 1981; The major histocompatibility complex in man. Past, present and future concepts. *Science* 213:1469-1474.
3. Perna NT, Batzer MA, Deininger PL, Stoneking M. 1992; *Alu* insertion polymorphism: A new type of marker for human population studies. *Human Biology* 64:641-648.
4. Greally JM. 2002; Short interspersed transposable elements (SINEs) are excluded from imprinted regions in the human genome. *PNAS* 99:327-332.
5. Deininger PL, Daniels GR. 1986; The recent evolution of mammalian repetitive elements. *Trends Genet* 2:76-80.
6. Houck CM, Rinehart FP, Schmid CW. 1979; A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J Mol Biol* 15; 132(3):289-306.
7. Novick GE, Novick CC, Yunis J, Martinez K, Duncan GG, et al. 1995; Polymorphic human specific *Alu* insertions as markers for human identification. *Electrophoresis* 16(9):1596-601.
8. Batzer MA, Deininger PL. 1991; A human-specific subfamily of *Alu* sequences. *Genomics* 9:481-487.
9. Degen SJ, Rajput B, Reich E. 1986; The human tissue plasminogen activator gene. *J Biol Chem* 261: 6972-6985.
10. Batzer MA, Arcot SS, Phinney JW, Alegria-Hartman M, Kass DH, Milligan SM, Deininger, Mark Stoneking. 1996; Genetic Variation of Recent *Alu* Insertions in Human Populations. *J Mol Evol* 42:22-29.