

ISSN 2591-6653

Naturalia

Patagónica

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

VOLUMEN 11 (2018)



NATALIA PATAGONICA

Volumen 11 – 2018

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Director

Dr. Osvaldo León Córdoba

Secretaria de Redacción

Dra. María Luján Flores

Tesorera

Dra. Mabel Sandra Feijóo

Editor

Dr. Osvaldo León Córdoba

Comité Editor

Dra. Graciela Pinto Vitorino
Lic. María del Rosario Carballo
Dra. Nerina Iantanos
Dra. Mónica Casarosa
Dra. Ofelia Iris María Katusich

Evaluadores

Dra. Estela Lopretto	Dra. Mirta Arriaga	Lic. Gabriel M. Martin
Dra. Marta Collantes	Dra. Martha Gattuso	Dra. Alicia Boraso
Dr. Gabriel Oliva	Dra. Susana Gattuso	Dra. María Cecilia Rodríguez
Dr. Juan Manuel Sayago	Dra. Cristina de Villalobos	Dra. Teresita Montenegro
Ing. Agr. Antonio D. Dalmaso	Dr. Carlos Arturo Stortz	Dra. María Cristina Matulewicz
Dr. Leonardo Salgado	Dr. Diego Pol	Dra. Ana María Giulietti
Dra. Laura Beatriz López	Dr. Daniel Delamo	Dra. Isabel Moreno Castillo
Dra. Mirta E. Valencia	Dra. Susana Gorzalczany	Dra. Adriana Brousalis
Dra. María Elena Arce	Dra. María Luján Flores	

CONTENIDO

ARTICULOS CIENTIFICOS.

PRINCIPALES EVIDENCIAS MORFOLÓGICAS Y ECOLÓGICAS QUE CARACTERIZAN Y DISTINGUEN A LAS ESPECIES SIMPÁTRICAS *LIOLAEMUS ZULLYAE* Y *LIOLAEMUS SCOLARO* (REPTILIA, SAURIA, LIOLAEMIDAE). José Alejandro Scolaro, Herman Núñez y Lorena Obregón Streitemberger. 01-14

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ESPECIES DE LAGARTOS DE LAS ROCAS DEL NORESTE DEL CHUBUT. Lorena Obregón Streitemberger, María Rosa Klagges, Juan Francisco Escobar y José Alejandro Scolaro. 15-31

ANÁLISIS BOTÁNICOS Y FITOQUÍMICOS COMPARATIVOS DE UNA ESPECIE AROMÁTICA Y MEDICINAL ENDÉMICA DE LA PATAGONIA (*ADESMIA BORONIOIDES* HOOK.F.) INTRODUCIDA A CULTIVO. Silvia Beatriz González, Fresia Melina Silva Sofrás, Bruno Gastaldi, Ariel Omar Mazzoni, Gustavo Sánchez, Paola María del Rosario Di Leo Lira, Daiana Sabrina Retta, Catalina María van Baren y Arnaldo Luis Bandoni..... 32-42

PRINCIPALES IMPACTOS ESPERADOS Y ACTIVIDADES DE ADAPTACIÓN PROPUESTAS FRENTE AL CAMBIO GLOBAL PARA EL CENTRO-NORTE DEL CHUBUT, PATAGONIA ARGENTINA. Cynthia C. González, Magdalena Llorens y Daniela Anabel Calderón. 43-58

HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA EN LA POBLACIÓN ADULTA DE PUERTO MADRYN. Lucas Federico Arce, Luis Orlando Pérez, Silvina Fleischer, Silvina Camarda, Cintia Llull, Ulises Toscanini, Nestor Basso y María Laura Parolín..... 59-72

NOTAS CORTAS

SITUACION ACTUAL DE LA PRACTICA DE LA AUTOMEDICACION EN UN SECTOR DE LA POBLACION UNIVERSITARIA DE LA UNPSJB. Analía Uhrich, Camila Galarza, Romina Avila, Sofía Cárcamo, Mónica Casarosa, Graciela Pozzi, Alejandra Apesteguía, Meliza Schmidt, Marianela Robles, Graciela Pinto Vitorino, Miriam Escobar Daza, Mónica Becerra, María E Flores, Susana Risso y Sandra Alcalde Bahamonde..... 73-83

TESIS DE DOCTORADO DE DOCENTES E INVESTIGADORES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO.

BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DEL ERIZO DE MAR *Pseudechinus magellanicus* (Echinoidea: Temnopleuridae) EN PATAGONIA CENTRAL. Tesista: Damián Gaspar Gil. Directora: Dra. Estela C. Lopretto; Co-director: Dr. (h.c.) Héctor E. Zaixso. 84-88.

VALIDACIÓN QUÍMICA Y BIOFARMACOLÓGICA DE ESPECIES DE ALGAS MARINAS DEL GENERO *ULVA* CON POTENCIALIDAD TERAPÉUTICA, COLECTADAS EN EL GOLFO SAN JORGE (PATAGONIA ARGENTINA). Tesista: Dra. Analía Verónica Uhrich. Director: Dra. María Lujan Flores; Codirector: Dr. Osvaldo León Córdoba. 89-96

TESIS DE MAESTRIA DE DOCENTES E INVESTIGADORES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO.

ADOLESCENTES ESCOLARIZADOS Y REPRESENTACIÓN SOCIAL ANTE EL CONSUMO DE MARIHUANA. Tesista: Lic. Mansilla Enrique. Directora: Mg. Raijenstein Gloria. 97-104

CONTENTS

RESEARCH ARTICLES

MAIN MORPHOLOGICAL AND ECOLOGICAL EVIDENCES CHARACTERIZING THE SYMPATRIC SPECIES *LIOLAEMUS ZULLYAE* AND *LIOLAEMUS SCOLARO* (REPTILIA, SAURIA, LIOLAEMIDAE). José Alejandro Scolaro, Herman Núñez and Lorena Obregón Streitemberger. 01-14.

COMPARATIVE STUDY OF THE ROCKY'S LIZARD SPECIES OF THE NORTHEAST OF CHUBUT. Lorena Obregón Streitemberger, María Rosa Klagges, Juan Francisco Escobar and José Alejandro Scolaro..... 15-31

COMPARATIVE BOTANICAL AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF A CULTIVATED AROMATIC AND MEDICINAL SPECIE ENDEMIC FROM PATAGONIA (*ADESMIA BORONIOIDES* HOOK. F.). Silvia Beatriz González, Fresia Melina Silva Sofrás, Bruno Gastaldi, Ariel Omar Mazzoni, Gustavo Sánchez, Paola María del Rosario Di Leo Lira, Daiana Sabrina Retta, Catalina María van Baren and Arnaldo Luis Bandoni..... 32-42

MAIN EXPECTED IMPACTS AND ADAPTATION ACTIVITIES PROPOSED IN FRONT OF THE GLOBAL CHANGE FOR THE NORTH-CENTRAL CHUBUT, PATAGONIA ARGENTINA. Cynthia C. González, Magdalena Llorens and Daniela Anabel Calderón..... 43-58

HEREDITARY HAEMOCHROMATOSIS IN THE ADULT POPULATION OF PUERTO MADRYN. Lucas Federico Arce, Luis Orlando Pérez, Silvina Fleischer, Silvina Camarda, Cintia Llull, Ulises Toscanini, Nestor Basso and María Laura Parolín. 59-72

SHORT NOTES

CURRENT SITUATION OF THE PRACTICE OF SELF-MEDICATION IN A SECTOR OF THE UNIVERSITY POPULATION OF THE UNPSJB. Analía Uhrich, Camila Galarza, Romina Avila, Sofía Cárcamo, Mónica Casarosa, Graciela Pozzi, Alejandra Apesteguía, Meliza Schmidt, Marianela Robles, Graciela Pinto Vitorino, Miriam Escobar Daza, Mónica Becerra, María E Flores, Susana Risso and Sandra Alcalde Bahamonde..... 73-83

THESIS DOCTOR DEGREE OF RESEARCH OF THE FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO.

BIOLOGY AND ECOLOGY OF THE SEA URCHIN *PSEUDECHINUS MAGELLANICUS* (ECHINOIDEA: TEMNOPLEURIDAE) AT CENTRAL PATAGONIA. Thesis Damián Gaspar Gil. Director: Dra. Estela C. Lopretto; Co-Director: Dr. (h.c.) Héctor E. Zaixso..... 84-88

CHEMICAL AND BIOPHARMACOLOGICAL VALIDATION OF MARINE ALGAE SPECIES OF THE *ULVA* GENUS WITH THERAPEUTIC POTENTIAL, COLLECTED IN THE SAN JORGE GULF (ARGENTINE PATAGONIA). Thesis: Dra. Analía Verónica Uhrich. Director: Dra. María Lujan Flores; Codirector: Dr. Osvaldo León Córdoba. 89-96

THESIS MASTHER DEGREE OF RESEARCH OF THE FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO.

SCHOOL TEENAGERS AND SOCIAL REPRESENTATION RELATED TO MARIJUANA. Thesis Lic. Mansilla Enrique. Director: Mg. Raijenstein Gloria.. 97-104

Hemocromatosis Hereditaria en la Población Adulta de Puerto Madryn

Hereditary Haemochromatosis in the Adult Population of Puerto Madryn

**Lucas Federico Arce^{1*}, Luis Orlando Pérez², Silvina Fleischer³, Silvina Camarda⁴,
Cintia Llull⁵, Ulises Toscanini⁵, Nestor Basso¹ y María Laura Parolín¹**

¹Instituto de Diversidad y Evolución Austral (IDEAus), CCT CONICET-Centro Patagónico, Puerto Madryn, Chubut.

²Instituto de Patagónico de Ciencias Sociales y Humanas (IPCSH), CCT CONICET-Centro Patagónico, Puerto Madryn, Chubut.

³Servicio de Hemoterapia del Hospital Sub-Zonal Andrés Isola, Puerto Madryn, Chubut.

⁴Laboratorio de Análisis Clínicos Aguamarina, Rada Tilly, Chubut.

⁵Primer Centro Argentino de Inmunogenética (PRICAI), Fundación Favaloro, Buenos Aires, CABA)

Correspondencia: lucasfarce@hotmail.com

RESUMEN

La hemocromatosis hereditaria (HH) es un desorden autosómico recesivo que genera la absorción excesiva de hierro y acumulación de este elemento en diversos órganos vitales. Los efectos atribuidos a dicha patología incluyen el aumento de riesgo de hepatocarcinoma, artritis, miocardiopatía, diabetes y otras dolencias que disminuyen la esperanza de vida en diez años. Sin embargo, su detección temprana permite el tratamiento específico de la enfermedad. Diversos estudios realizados en Europa han demostrado que las poblaciones de origen celta poseen la frecuencia más alta (10-13%) de los genotipos causales de HH (alelo C282Y y H63D). No obstante la incidencia de marcadores de riesgo para la enfermedad en poblaciones nativo americana y mestizadas ha sido poco explorada. La población de Puerto Madryn resulta de especial interés, por presentar un origen fundacional europeo, principalmente galés, español e italiano y también por presentar un alto componente nativo americano. En el presente estudio se analizaron 75 muestras sanguíneas de donantes voluntarios no emparentados que concurrieron a las campañas de donación para médula ósea del Hospital Zonal. Mediante el estudio de 46 marcadores de ancestría se estimó el mestizaje genético individual (europeo, nativo americano y africano); y mediante el análisis de las regiones del brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), se determinó la presencia de alelos de riesgo para la HH. Asimismo se analizó el nivel de hierro en sangre mediante el análisis de transferrina. Complementariamente, a cada participante se le realizó una encuesta de

estilo de vida y genealógica. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de los marcadores de riesgo para HH en un 40% de la muestra de Puerto Madryn, con mayor frecuencia del alelo H63D (36%) seguido de C282Y (6%). No se observó correlación entre la presencia de los alelos de riesgo, estilo de vida y antecedentes familiares. Se observó una marcada influencia de la ancestría europea (85%) en los portadores de los polimorfismos de riesgo. El presente trabajo constituye una primera aproximación al estudio de HH en una población de Patagonia abordando el componente ancestral individual y poblacional. Los resultados remarcan la necesidad conocer la estructura genética de las poblaciones humanas para comprender la incidencia de enfermedades hereditaria tanto locales como migrantes, especialmente en países como Argentina de constitución biológica pluriétnica y pluricultural.

PALABRAS CLAVE: Hemocromatosis hereditaria, Patagonia, mestizaje.

ABSTRACT

Hereditary hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder that generates excessive absorption of iron and its accumulation in various vital organs. The effects attributed to this pathology include the increased risk of liver cancer, arthritis, cardiomyopathy, diabetes and other consequences that decrease life expectancy in ten years. However, its early detection allows specific treatment of the disease. Several studies conducted in Europe have shown that populations of Celtic origin have the highest frequency (10-13%) of the causal genotypes of HH (allele C282Y and H63D). However, the incidence of risk markers for the disease in Native American and admixed populations has been little explored. The population of Puerto Madryn is of special interest, because it presents a European foundational origin, mainly Welsh, Spanish and Italian and it presents a high Native American component. In the present study, 75 blood samples were analysed from unrelated voluntary donors who attended the donation campaigns for bone marrow of the Zonal Hospital. By studying of 46 markers of ancestry, individual genetic miscegenation (European, Native American and African) was estimated; and by analysing the regions of the short arm of chromosome 6 (6p21.3), the presence of risk alleles for HH was determined. The level of iron in blood was analysed by transferrin quantification. In addition, each participant was interviewed about his lifestyle and genealogy. The results obtained showed the presence of risk markers for HH in 40% of the samples from Puerto Madryn, with a higher frequency of

the H63D allele (36%) followed by C282Y (6%). No correlation was observed between the presence of risk alleles, lifestyle and family history. A marked influence of European ancestry (85%) was noted in the carriers of the risk polymorphisms. This work constitutes a first approach to the study of HH in a population of Patagonia, addressing the individual and population ancestral component. The results highlight the need to know the human populations structure to understand the incidence of hereditary diseases both local and migrant, especially in countries such as Argentina with multiethnic and multicultural biological constitution.

Key words: Hereditary haemochromatosis, Patagonia, miscegenation.

INTRODUCCIÓN

Metabolismo del Hierro

El hierro tiene una función esencial en el metabolismo de los mamíferos, por su capacidad para aceptar y ceder electrones, como componente fundamental del grupo hemo de la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos y otras enzimas. Por otro lado, el hierro reacciona con el oxígeno formando radicales hidroxilo y anión superóxido que causan daño oxidativo al interactuar con moléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El organismo debe mantener la homeostasis del hierro para asegurar las actividades biológicas normales, sin que se produzcan efectos nocivos. El control de los niveles sistémicos de hierro se logra principalmente mediante la regulación de la absorción intestinal del mismo presente en los alimentos. No se conocen mecanismos que regulen

su excreción, pero se sabe que hay una pequeña pérdida fisiológica por exfoliación de células intestinales y pérdidas menstruales (Domenico, Ward, and Kaplan 2008). El hierro en solución puede encontrarse en dos estados de oxidación, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}) y es muy poco soluble a pH fisiológico. Por este motivo, los organismos vivos se valen de proteínas para transportarlo y almacenarlo (transferrina y ferritina respectivamente) de manera que no sea tóxico (Iolascon et al. 2009). Una forma de cuantificar el hierro en plasma es midiendo la concentración de transferrina insaturada que guarda una relación inversa con la concentración del mismo (García Rosolen et al. 2010).

Hemocromatosis Hereditaria Tipo 1

Los problemas en la acumulación de hierro, por déficit o por sobrecarga, pueden desencadenar el inicio de enfermedades crónicas debilitantes.

Entre ellas, la condición más frecuente es la hemocromatosis hereditaria (HH), un desorden autosómico recesivo que genera la absorción excesiva de hierro (hasta tres veces mayor que la absorción normal) en la pared intestinal. El mismo se acumula en las células parenquimáticas del hígado, páncreas, corazón y otros órganos vitales (Andrews, 2016). Los efectos atribuidos a dicha patología incluyen el aumento de riesgo de hepatocarcinoma, artritis, miocardiopatía, diabetes y otras dolencias que disminuyen la esperanza de vida en diez años. La HH también resulta en la deposición de hierro en la glándula pituitaria anterior, conduciendo a un fallo en la liberación hormonal y un daño en las funciones sexuales en etapas avanzadas. Sin embargo, su detección temprana permite el tratamiento específico de la enfermedad, normalizando la expectativa y calidad de vida (Rosenbaum & Morgan, 2013).

La forma más frecuente de HH (también conocida como HH tipo 1) es asociada con una mutación en el gen que codifica para la proteína HFE (por la sigla en inglés “high Fe”, que significa “hierro alto”) que es una proteína de membrana que constituye un factor clave en la restricción de la absorción de hierro en las paredes del duodeno (Figura 1).

Las mutaciones en el gen HFE producen un plegamiento anómalo en la proteína HFE que impide que limite el ingreso de hierro. Este proceso conduce a un aumento de la absorción intestinal de hierro con aparición de hierro libre en la circulación que es incorporado por hígado, corazón, páncreas y otros órganos (García Rosolen et al. 2010).

La primera mutación descrita causante de HH fue la C282Y, nombrada así porque resulta en la sustitución de una cisteína por tirosina en el aminoácido 282 de la proteína HFE (Figura 1). Esta mutación rompe un puente disulfuro alterando la conformación de la proteína HFE, inhibiendo su expresión en la membrana plasmática y, por lo tanto, no cumple su función en la regulación del ingreso de hierro. Dicho proceso resulta en el incremento en la absorción del hierro y, frecuentemente, en hemocromatosis (Muckenthaler, 2017). Sin embargo, esta mutación es la responsable de entre el 60 y el 80 % de los casos de HH (Leão et al. 2014).

Una segunda mutación, vinculada a la HH, es la H63D, nombrada así porque resulta en una sustitución de histidina por aspartato en el aminoácido 63 de la proteína HFE (Figura 1) y está asociada con la forma menos nociva de la enfermedad. Esto se debe a que esta mutación produce un plegamiento

anómalo de la proteína HFE y conduce sólo a una disminución parcial de su eficacia regulatoria. Esta mutación

representa entre el 40% y el 70% de los casos de HH en ausencia de la mutación C282Y (Leão et al. 2014).

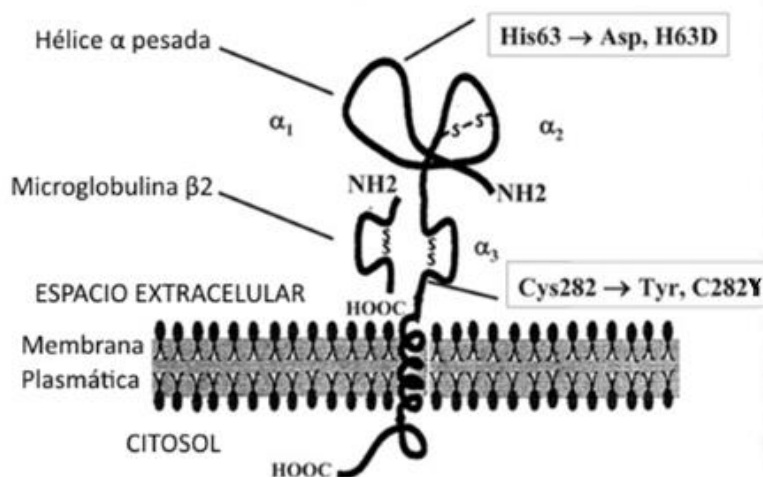


Figura 1. Representación esquemática de Proteína HFE donde se identifican las dos mutaciones principales. Modificada de Bacon et al. (2011).

Figure 1. Schematic representation of HFE protein where the two main mutations are identified. Modified from Bacon et al. (2011).

La expresión fenotípica de hemocromatosis no sólo depende de la severidad del arreglo genético, sino que también depende de la compleja interacción de estas variables con otras de influencia ambiental como la ingesta de hierro en la dieta, procesos fisiológicos de pérdida de hierro, enfermedades y toxinas (como el alcohol) que intervienen en el metabolismo del hierro (Hanson et al. 2001) como también por la diferencia interregional en la frecuencia de otras mutaciones que alteran la homeostasis del hierro (Leão et al. 2014).

En los países europeos, la homocigosis del alelo C282Y es el responsable de entre el 52% y 96% de los casos de hemocromatosis; y la prevalencia de homocigotas y heterocigotas es de 0.4 y 9.2% respectivamente. Por lo tanto, se espera en poblaciones europeas encontrar una prevalencia de HH de 51 a 64 personas de cada 10.000 (Liebert et al. 2000). Por su parte, para la variante alélica H63D, la frecuencia de homocigosis es de 2% promedio para países europeos (Hanson et al. 2001). Esta variante presenta una distribución más amplia que la anterior (con frecuencias superiores al 20% en

Europa, pero también entre el 5 y el 10% en Asia y África, y entre el 6,3 y 7,5% en las poblaciones norteamericanas) lo que indicaría una antigüedad mayor (Liebert et al. 2000). No obstante, la incidencia de marcadores de riesgo para la enfermedad en poblaciones nativo americanas y mestizadas ha sido poco explorada (Leão et al. 2014; Wolff et al. 2006). En este sentido, la población de Puerto Madryn, ubicada en la región costera norte de la Patagonia central argentina (provincia de Chubut), resulta de especial interés como población de estudio, por presentar un origen fundacional europeo, derivado de la inmigración galesa, española e italiana entre otros y también por exhibir un alto componente nativo americano local y derivado de migraciones internas y desde países limítrofes (Parolin et al. 2013). En la Argentina se conocen solo dos trabajos relacionados a la enfermedad de HH, uno realizado en la población de Córdoba (Soria et al. 2009) y el segundo en Buenos Aires (Colombo et al. 2014). En ambos estudios se obtuvieron frecuencias similares a las registradas en España e Italia para los alelos de riesgo asociados a la enfermedad (C282Y 5% y H63D 30%) (EASL, 2010). Estos valores son concordantes con el origen ancestral de

las localidades, donde gran parte de los migrantes arribados a la región central del país entre los años 1890 y 1945, provenían mayormente de esos países europeos (Avena et al. 2001). No obstante, no se conocen estudios previos realizados sobre la incidencia de la HH y los factores de riesgo en otras regiones del país, como la Patagonia, que presenta una estructura poblacional diversa y con una mayor prevalencia nativo americana (Parolin et al. 2015). Dada la ausencia de antecedentes sobre la incidencia de la HH en poblaciones mestizas, se destaca la necesidad de contar con registros epidemiológicos detallados sobre la frecuencia de HH en distintos lugares de nuestro país, así como la identificación de grupos de riesgo a fin de aportar al conocimiento general de esta enfermedad en nuestra región. Al mismo tiempo, se remarca la necesidad de realizar estudios de posible asociación entre origen étnico y la frecuencia de los alelos de riesgo para HH en poblaciones mestizadas que presentan una marcada prevalencia de raíces nativo americanas.

El objetivo de este estudio es evaluar la presencia y prevalencia de los polimorfismos genéticos asociados a la enfermedad de hemocromatosis HH (C282Y y H63D) y su influencia sobre la acumulación de hierro en la

población general de la ciudad de Puerto Madryn, provincia de Chubut, tomando en consideración factores de estilo de vida y antecedentes familiares en diferentes grupos étnicos y geográficos. Asimismo, se analizará una posible asociación entre el mestizaje genético (origen geográfico ancestral: nativo americano-europeo-africano) y la prevalencia de dichos marcadores de riesgo para la HH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra Biológica

Se analizaron 75 muestras sanguíneas no infecciosas que fueron tomadas a donantes voluntarios que asistieron a campañas de donación de médula ósea organizadas por el Servicio de Hemoterapia del Hospital Sub-Zonal Andrés Isola durante el año 2015. El comité de bioética de dicho hospital avaló el desarrollo del presente proyecto (Resolución 009/2013).

Encuesta

Previa firma de un consentimiento informado, a cada donante se le realizó una encuesta de estilo de vida (relacionada a la ingesta de hierro y actividad física), antecedentes familiares y ancestría geográfica. Las encuestas fueron asistidas por el investigador con el fin de aclarar dudas que se puedan generar sobre las

consignas y homogeneizar criterios a la hora de completarlas.

Extracción de ADN

La extracción de ADN fue realizada a partir de 300µL de sangre entera conservada en anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetracético) utilizando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit-Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se extrajeron una totalidad de 75 muestras de ADN. Luego de la extracción, las muestras fueron cuantificadas en gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio y visualizadas bajo luz UV.

Genotipificación de Marcadores de Ancestría Individual (AIMs)

La tipificación de 46 marcadores AIMs-INDELS (marcadores autosómicos de ancestría individual de Inserción-Delección) para la estimación de mestizaje individual y poblacional (proporción de mezcla génica europea-amerindia-africana) se realizó en forma colaborativa con el Primer Centro Argentino de Inmunogenética (PRICAI) de la Fundación Favaloro (Buenos Aires, CABA).

La genotipificación de los Indels se llevó a cabo mediante una única reacción en cadena de polimerasa (PCR) multiplex y los fragmentos fueron identificados según su tamaño

base mediante un Analizador Genético capilar ABI3130 (Applied Biosystems) y fueron analizados con el programa Genemapper v3.2 (Pereira et al. 2012).

Genotipificación de los alelos de riesgo asociados a HH

Mediante reacción de PCR, se amplificaron los genes HFE 562 y HFE 945 a fin de determinar la presencia de los alelos de riesgo C282Y y H63D respectivamente. Para ello, se utilizaron los cebadores detallados en la tabla I.

Tanto la reacción de PCR y el control de amplificación en gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio fueron realizados en el Laboratorio de Identificación genética (IDEGEN) del Instituto de Diversidad y Evolución Austral (CCT-CENPAT). Se realizó una pirosecuenciación de los productos de PCR que consistió en la secuenciación del gen que codifica para la proteína HFE con el fin de identificar en él la presencia de mutaciones. La misma fue realizada por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular del IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-CONICET), Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Cuantificación de Transferrina

Para estimar la concentración de hierro en sangre se cuantificó la transferrina insaturada en suero. Ésta se relacionan de manera inversa, ya que la

concentración de transferrina insaturada aumenta en la deficiencia de hierro (García Rosolen et al. 2010).

De cada muestra de sangre se separó el suero que fue inmediatamente congelado para su posterior análisis. La estimación de Tf se realizó en el laboratorio de análisis clínicos Aguamarina de la ciudad de Rada Tilly (Chubut), mediante el método inmuniturbidimétrico.

Análisis estadístico de los resultados

La relación entre las variables dependientes (polimorfismos genéticos) y las variables independientes (ingesta de hierro, antecedentes de salud, actividad física y ancestría) fue evaluada mediante el cálculo de matriz de correlaciones de Spearman, de modelos lineales generalizados (GLM) y de análisis de componentes principales (PCA). Estos análisis fueron realizados mediante paquetes estadísticos en lenguaje R (<http://R-project.org>). La proporción de mezcla genética se estimó considerando un modelo tri-híbrido (con tres poblaciones parentales: nativa americana, europea y africana) utilizando los programas STRUCTURE (<http://pritchardlab.stanford.edu/structure.html>) y ADMIXTURE (<http://genetics.ucla.edu/software/admixture>). Las frecuencias alélicas de las

poblaciones parentales fueron gentilmente cedidas por el Dr. Rui Pereira (Pereira et al. 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los datos genealógicos

Las encuestas realizadas a los donantes permitieron obtener conocimiento sobre su lugar de residencia, nacimiento y de las tres generaciones precedentes (padres, abuelos y bisabuelos). Se observó que sólo el 7% de los dadores son nacidos en la ciudad de Puerto Madryn, lo que remarca el gran componente alóctono. Con respecto al origen ancestral biparental, las

encuestas mostraron que en las distintas generaciones (a excepción de los bisabuelos) predominan individuos nacidos en el centro del país, tomando como tal a las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa y Entre Ríos; representado en un 49% para los dadores, un 51% para los padres y un 37% para los abuelos. Para los bisabuelos se observa una mayor proporción nacida en el exterior del país, con un 25% en España, otro 25% en Italia y 16% de otros países europeos entre los que se encuentran Portugal, Alemania y Polonia (Figura 2).

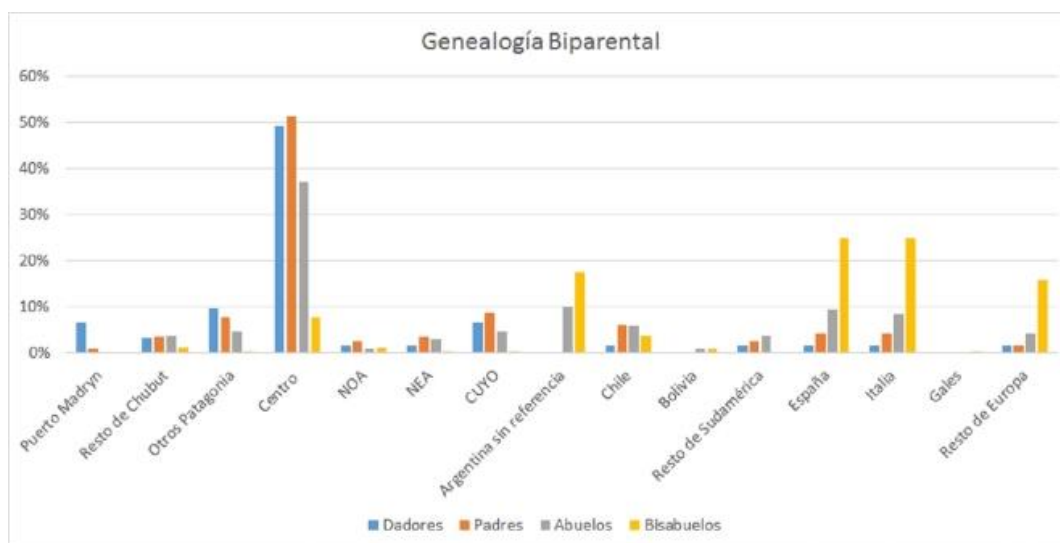


Figura 2. Frecuencia de lugares de nacimiento de los donantes y de las tres generaciones precedentes. Otros Patagonia: Provincias de Santa Cruz, Neuquén, Tierra del Fuego; Centro: Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa, Entre Ríos; NOA (noroeste argentino): Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Santiago del Estero; NEA (noreste argentino): Formosa, Chaco, Corrientes, Misiones; Cuyo: Mendoza, San Juan, San Luis.

Figure 2. Frequency of places of birth of donors and of the three preceding generations. Otros Patagonia: Provinces of Santa Cruz, Neuquén, Tierra del Fuego; Center: Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa, Entre Ríos; NOA (northwestern Argentina): Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Santiago del Estero; NEA (Argentine northeast): Formosa, Chaco, Corrientes, Misiones; Cuyo: Mendoza, San Juan, San Luis.

De la frecuencia de alelos de riesgo de HH en Puerto Madryn

En la muestra total amplificada (N=47) para estimar la frecuencias de los alelos de riesgo de HH (H63D y C282Y), no se encontraron genotipos homocigotas para ninguna de las dos mutaciones. Sin embargo, ambas variantes se encontraron presentes en la muestra

poblacional con una marcada prevalencia de la mutación H63D (36%) respecto a C282Y (6%). Asimismo, se detectó un 2% de casos que presentan ambas mutaciones, siendo estos donantes susceptibles a presentar sobrecarga de hierro y manifestar la enfermedad (Figura 3).

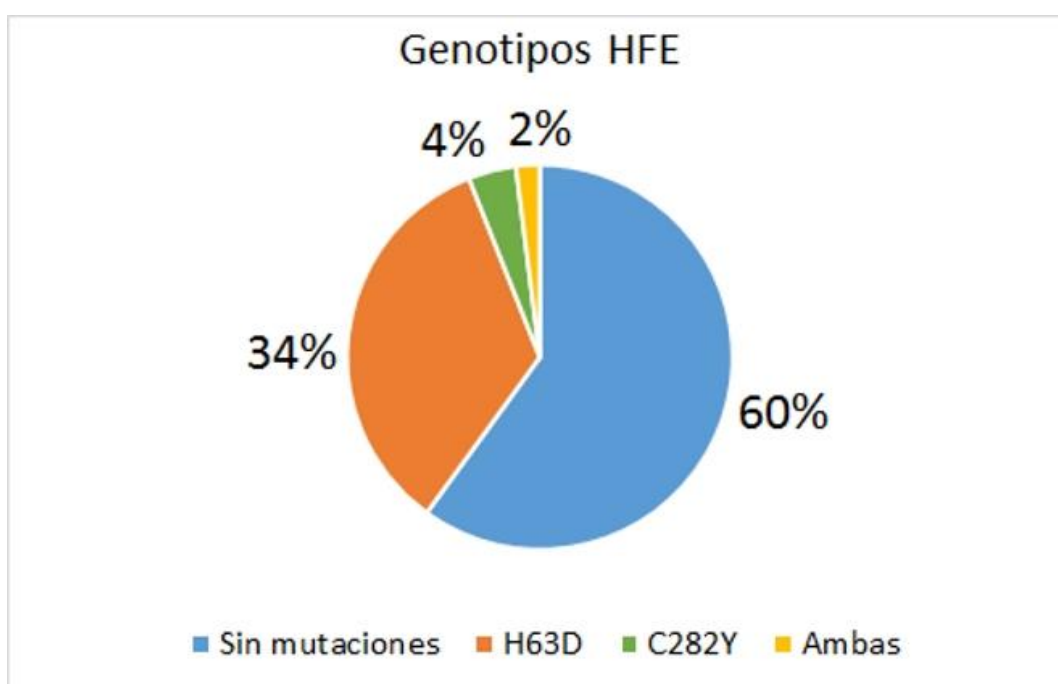


Figura 3. Proporción de los diferentes genotipos para el gen HFE encontrados en la muestra de la población de Puerto Madryn.

Figure 3. Proportion of the different genotypes for the HFE gene founded in the sample of the population of Puerto Madryn.

Los porcentajes observados son similares a los reportados por estudios realizados en otras ciudades sudamericanas. En la ciudad de Buenos Aires, se observó un 30% de portadores del alelo H63D y un 8% de C282Y (Colombo et al. 2014). En Santiago de Chile, 23% de los donantes voluntarios

de sangre eran portadores de la mutación H63D y 2% lo era de C282Y (Wolff et al. 2006).

Cabe destacar que la presencia de los alelos de riesgo no necesariamente está relacionada al desarrollo de HH. No obstante, numerosos muestreos realizados en distintas regiones de

muestran que entre el 80% y el 100% de los pacientes con HH presentan los alelos de riesgo asociados. Esto muestra que, si bien la presencia de los alelos no asegura desarrollar la enfermedad, la ausencia de los mismos indica una baja probabilidad de presentarla (Merryweather-Clarke et al. 1997).

De la HH y la ancestría

Los resultados del mestizaje obtenidos en la muestra de Puerto Madryn (N=75) registraron una composición genética poblacional de 80% europeo, 16% nativo americano y 4% africano.

De las 75 muestras identificamos las 22 que presentan alelos de riesgo. Se observa que la mayoría presenta una marcada tendencia a una línea europea (85% en promedio). Sin embargo, 4 muestras presentan el alelo de riesgo y, a su vez, tienen alto porcentaje de ancestría amerindia (40% en promedio). Descontando estas muestras, el resto presenta una ancestría europea promedio del 92%. Estos resultados sugieren una posible influencia de ancestría europea en la prevalencia del alelo de riesgo (Figura 4).

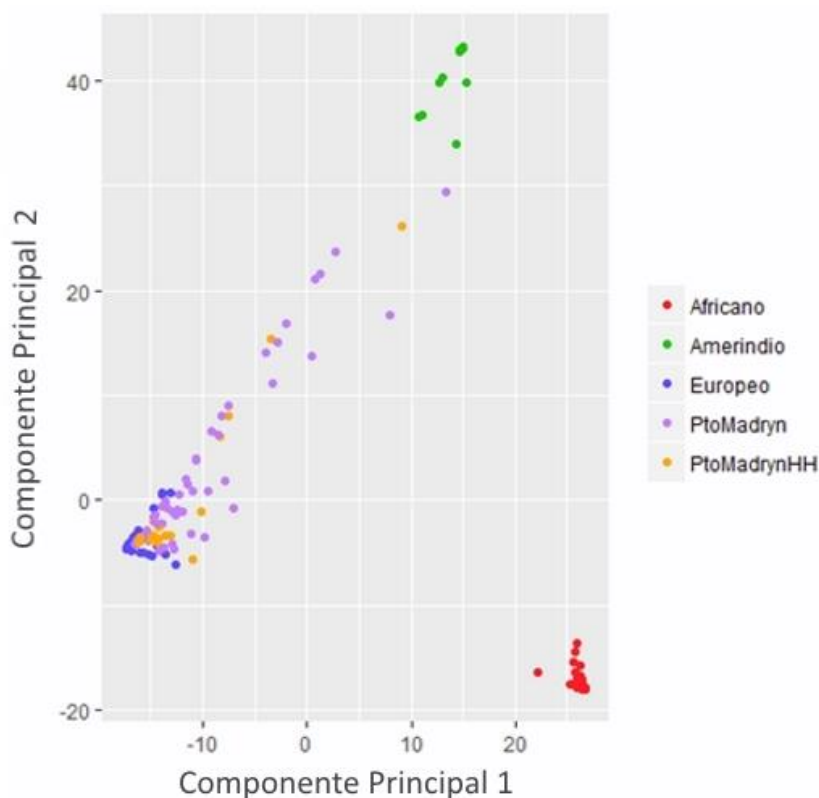


Figura 4. Biplot con datos ancestrales de poblaciones parentales tomadas como referencia (Pereira et al. 2012) y los datos obtenidos en Puerto Madryn con distinción de los individuos que presentan HH.

Figure 4. Biplot with ancestral data of parental populations taken as reference (Pereira et al. 2012) and data obtained in Puerto Madryn with distinction of individuals with HH.

De las 4 personas que presentan el alelo de riesgo y, a su vez, un alto contenido amerindio en su ancestría, sólo una reconoce en su encuesta genealógica una procedencia nativo americana en las generaciones que la precedieron, dos reconocen sólo ascendencia europea y una desconoce la procedencia de todas las generaciones previas.

De los datos de estilo de vida y transferrina en suero

Mediante la construcción de un modelo lineal generalizado (GLM) se observó que el efecto del genotipo (homocigota sin mutación, heterocigota, homocigota mutado; para alelo C282Y y para H63D) sobre los niveles de transferrina en suero es significativo (valor $p = 0,0172$). Estos resultados son consistentes con lo esperado ya que los niveles de transferrina libre disminuyen ante la sobrecarga de hierro, y ésta a su vez aumenta con la presencia de los alelos de riesgo (García Rosolen et al. 2010). A la vez, análisis de correlaciones de Spearman (ρ_s) que los niveles de Tf mostraron ser levemente más elevados en mujeres que en hombres ($\rho_s = 0,38$). Esto puede deberse a que las mujeres pueden experimentar deficiencia de hierro debido a la pérdidas fisiológicas como la menstruación o la lactancia (García Rosolen et al. 2010; Heath et al. 2016).

Los análisis de componentes principales (PCA, por su sigla en inglés) no mostraron relación entre los antecedentes médicos de los donantes y sus familiares y los genotipos por lo que no se asoció ninguna dolencia al efecto de una posible HH no diagnosticada. A la vez, este mismo análisis no mostró una relación de los niveles de transferrina en suero con un estilo de vida particular por lo que el nivel de hierro se explicaría exclusivamente por el genotipo.

CONCLUSIÓN

Los resultados nos muestran la presencia de polimorfismos genéticos asociados a la enfermedad de Hemocromatosis Hereditaria Tipo 1 en una muestra de la población de Puerto Madryn, con una incidencia del 40% sobre el total de las muestras analizadas (36% para el H63D y 6% para el C282Y).

Se observó que la presencia de dichos alelos, a diferencia del estilo de vida y de los antecedentes familiares, tiene un efecto significativo en el nivel de hierro en suero de la población en general. Sin embargo, ese efecto es subclínico (es decir no se observaron niveles críticos de hierro en las muestras) y no indicaría necesariamente una tendencia al desarrollo de hemocromatosis.

A la vez, en este estudio, se observó una marcada influencia de la ancestría europea en relación a la presencia de los polimorfismos de riesgo. Dada la asociación observada entre ancestría genética y la frecuencia de las mutaciones para HH así como de otras enfermedades, nos demuestra que es de gran importancia la realización de estudios genéticos de ancestría a la hora de realizar estudios epidemiológicos poblacionales sobre la prevalencia, distribución y dispersión de enfermedades hereditarias en poblaciones contemporáneas y más aún, dado que la percepción social del mestizaje de las poblaciones argentinas tiende a ser diferente (por sub o sobreestimación de alguna línea parental) de los datos genéticos reales. Por último, cabe destacar que el presente trabajo constituye una primera aproximación a un estudio de Hemocromatosis Hereditaria Tipo 1 en Patagonia argentina. Asimismo es el primer trabajo sobre el estudio epidemiológico de una patología humana llevado a cabo en el CCT-CENPAT CONICET, en colaboración con el Hospital Andrés Bello. Además, es uno de los primeros estudios que aborda una posible correlación entre la prevalencia de los alelos de riesgo de la HH1 y el mestizaje u origen geográfico

individual de los donantes en Sudamérica. Conocer la estructura genética de las poblaciones es fundamental a la hora de desarrollar trabajos de biomedicina. En este sentido, se recomienda la realización de estudios más exhaustivos tanto de ésta como de otras patologías hereditarias, que incluyan conocer el origen genético continental de los participantes, siendo éste un factor clave para comprender las estructuras poblacionales que son producto de las migraciones y los procesos de mestizaje que inciden en la distribución de variantes genéticas asociadas a diferentes patologías a nivel mundial. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la necesidad de contar con más y mejores registros epidemiológicos poblacionales que incluyan conocer la diversidad genética y cultural tanto a nivel local como regional y nacional y, de esta forma, contribuir a la identificación de grupos de riesgo y brindar información para un uso óptimo de los recursos en la Salud Pública.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, N.C. 2016. Forging a Field: The Golden Age of Iron Biology. *Blood*, **112**:219–31.
- Avena, S.A. Goicoechea, A.S. Dugoujon, J.M. Slepoy, M.G. Slepoy, A.S. Carnese, F.R. 2001. Análisis Antropogénico de Los Aportes Indígena y Africano En Muestras Hospitalarias de La Ciudad de Buenos Aires. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, **3**: 79–99.

- Bacon, B.R. Adams, P.C. Kowdley, K.V. Powell, L.W. & Tavill, A.S. 2011. Diagnosis and Management of Hemochromatosis: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, **54**: 328–343.
- Colombo, F. Martínez, J. Varela, L. Gerez, E. Méndez, M. Batlle, A. Rossetti, M.V. & Parera, V.E. 2014. Porphyrin Cutanea Tarda and HFE Gene Mutations in Argentina. *British Journal of Medicine & Medical Research*, **4**: 1691–1700.
- Domenico, I. Ward, D. & Kaplan, J. 2008. Regulation of Iron Acquisition and Storage: Consequences for Iron-Linked Disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**: 72–81.
- García Rosolen, N. Eandi Erberle, S. Feliú Torres, A. & Musso, M. 2010. Conceptos Actuales Sobre Fisiología y Patología Del Hierro. *Hematología*, **14**: 48-57.
- Hanson, E.H. Imperatore, G. & Burke, W. 2001. HFE Gene and Hereditary Hemochromatosis: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*, **154**: 193–206.
- Heath, K.M. Axton, J.H. McCullough, J.M. & Harris, N. 2016. The Evolutionary Adaptation of the C282Y Mutation to Culture and Climate during the European Neolithic. *American Journal of Physical Anthropology*, **160**: 86–101.
- Iolascon, A. De Falco, L. & Beaumont, C. 2009. Molecular Basis Of Inherited Microcytic Anemia Due To Defects In Iron Acquisition Or Heme Synthesis. *Haematologica*, **94**: 395–408.
- Leão, G.D.R. Freire, J.M. Cunha Fernandes, A.L.A. Moura de Oliveira, T.M. Leão, N.D. Gil, E.A. De Vasconcelos, R.C. Azevedo, J.P.S. De Farias Sales, V.S. De Araújo Moura Lemos, T. M. Leão, M.D. Do Nascimento, F.F. Maciel, J.F.R. De Freitas, R.V. De Souza Paiva, A. & Cavalcanti, G.B. 2014. Analysis of HFE Genes C282Y, H63D, and S65D in Patients with Hyperferritinemia from Northeastern Brazil. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **28**: 178–85.
- Liebert, M.A. Merryweather-Clarke, A.T. Pointon, J.J. Jouanolle, A.M. Rochette, J. & Robson, K.J.H. 2000. Geography of HFE C282Y and H63D Mutations. *Genetic Testing*, **4**: 183-198.
- Merryweather-clarke, A.T. Pointon J.J. Shearman J.D. & Robson, K.J.H. 1997. Original Articles Global Prevalence of Putative Haemochromatosis Mutations. *Journal of Medical Genetics*, **34**: 275–78.
- Muckenthaler, M.U. 2017. How Mutant HFE Causes Hereditary Hemochromatosis. *Blood*, **124**: 1212–1214.
- Parolin, M.L. Avena, S.A. Fleischer, S. Pretell, M. Di Fabio, F. Rodríguez, D.A. Dejean, C.B. Postillone, M.B. Vaccaro, M.S. Dahinten, S.L. Manera & G. Carnese, F.R. 2013. Análisis de La Diversidad Biológica y Mestizaje En La Ciudad de Puerto Madryn (Prov. de Chubut, Argentina). *Revista Argentina de Antropología Biológica*, **15**: 61–75.
- Parolin, M.L. Real, L.E. Martinazzo, L.B. & Basso, N.G. 2015. Population genetic analyses of the Powerplex1 Fusion kit in a cosmopolitan sample of Chubut Province (Patagonia Argentina). *Forensic Science International: Genetics*, **19**: 221–22.
- Pereira, R. Phillips, C. Pinto, N. Santos, C. Dos Santos, S.E.B. Amorim, A. Carracedo, A. & Gusmão, L. 2012. Straightforward Inference of Ancestry and Admixture Proportions through Ancestry-Informative Insertion Deletion Multiplexing. *Plos One*, **7**: 1-10
- Rosenbaum, L. & Morgan, M. 2013. Genetic Haemochromatosis and Sexual Health in Men. *Trends in Urology & Men's Health*, **1**: 32–34.
- Soria, N.W. Isasi, S.C. Chaing, M.R. & Gerez de Burgos, N.M. 2009. Analysis of C282Y and H63D Mutations of the Hemochromatosis Gene (HFE) in Blood Donors from Córdoba, Argentina. *Annals of Hematology*, **88**: 77–79.
- Wolff, C.F. Armas, R.F. Frank, J. & Poblete, P.G. 2006. Mutaciones Del Gen de La Hemocromatosis En Donantes de Sangre Voluntarios y En Pacientes Con Profiría Cutánea Tarda En Chile. *Medicina*, **66**: 421–426.