

Cuba: Estudio de la historia del mestizaje y de las bases genéticas de la pigmentación de la piel utilizando marcadores autosómicos y uniparentales.

Autoría principal

Beatriz Marcheco Teruel¹.

Otros autores

Evelyn Fuentes Smith¹, Lilia Caridad Marín Padrón¹, Enrique J. Gómez Cabezas².

Entidad ejecutora principal

¹Centro Nacional de Genética Médica.

Entidades participantes

²Centro de Investigaciones Psicológicas y Sociológicas.

Autor para correspondencia

Beatriz Marcheco Teruel.

Centro Nacional de Genética Médica

Avenida 31, Esquina a 146 No. 3102. Reparto Cubanacán. Playa, La Habana. CP: 11600

Tel.208 0438.

Correo electrónico: beatriz@infomed. sld.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **Beatriz Marcheco Teruel** (50%): Concibió, diseño y organizó la investigación y gestionó los recursos necesarios para su desarrollo. Diseñó los instrumentos de toma de datos, realizó el genotipaje de los marcadores en los laboratorios, diseño los ficheros para el análisis de los resultados. Realizó el análisis de los principales resultados mediante el programa ADMIXMAP y condujo el resto de los análisis estadísticos. Ha redactado como autor principal los artículos publicados.
- ✓ **Evelyn Fuentes Smith** (25%): Participo en la aplicación de los instrumentos de recogida de datos, así como en la medición de los índices de melanina a los individuos estudiados en todas las provincias del país. Realizó los restantes análisis estadísticos a partir de los resultados del ADMIXMAP y participó en la interpretación de los resultados.
- ✓ **Lilia Garidad Marin Padrón** (15%): Participo en la aplicación de los instrumentos de recogida de datos, así como en la toma de la muestra de sangre y la medición de los índices de melanina a los individuos estudiados en todas las provincias del País.
- ✓ **Enrique Javier Gómez Cabezas** (10%): Participo en el diseño de la investigación y de los instrumentos de recogida de datos. Coordinó y organizó el proceso de aplicación de los instrumentos y toma de muestras biológicas en todo el país. Participó en el análisis de los resultados y contribuyó en la redacción de los artículos publicados.

Resumen

La presente investigación constituye el más amplio estudio realizado con el fin de caracterizar el genoma cubano. Los resultados revelan las características genéticas de los grupos humanos originarios del pueblo cubano que se mantienen conservadas en sus generaciones actuales. Su importancia e impacto están dados por el valor de sus

hallazgos para todo estudio en particular que se proponga abordar la predisposición genética a padecer cualquier enfermedad (predisposición que puede estar mediada por el origen étnico de la población cubana), sus aportes a la Antropología, y a la propia Historia del país. Se abordan el mestizaje étnico y los genes relacionados con la pigmentación de la piel al estudiar a 1 019 individuos de todas las provincias y el municipio Isla de la Juventud, utilizando un panel de 128 marcadores genéticos informativos para el origen ancestral y 30 marcadores en el ADN mitocondrial y cromosoma Y. Con ello se estimaron las proporciones del mestizaje individual y como promedio para toda la muestra, y sus patrones de distribución geográfica. Se realizó además un estudio de asociación alélica con marcadores ubicados en 15 genes relacionados con la pigmentación, el primero de su tipo en el país, y se analizó su relación con medidas cuantitativas de pigmentación de la piel.

La contribución promedio de genes de origen Europeo, Africano y Nativo Americano en los individuos estudiados fue de 72%, 20% y 8% respectivamente. Las provincias orientales mostraron una mayor proporción de genes Africanos y Nativo Americanos comparadas con las provincias occidentales. En particular, Guantánamo (40%) y Santiago de Cuba (39%) mostraron los valores más altos de genes de origen Africano y Granma (15%), Holguín (12%) y Las Tunas (12%) las más altas proporciones de genes Nativo Americanos. Adicionalmente, se identificó un patrón sesgado asociado al sexo en el flujo génico entre las diferentes generaciones, con una mayor contribución de ancestros Africanos y Nativo Americanos por la vía de los linajes maternos, y de ancestros Europeos por vía paterna. Finalmente, dos marcadores ubicados en los genes *SLC24A5* y *SLC45A2*, mostraron asociación significativa con la pigmentación de la piel.

El estudio concluido es el más extenso y abarcador realizado sobre la caracterización genética del mestizaje étnico cubano y el primero en el país en analizar los genes para el color de la piel. Los resultados fueron publicados el 24 de Julio pasado en la revista *PLoS Genetics*, ubicada en el lugar **No. 9** entre las alrededor de 200 que publican temas de genética, con un **factor de impacto** según *Thomson Reuters* de **8.69**. Se han realizado en total **6 publicaciones** con los resultados de este estudio (4 en Revistas Internacionales de alto impacto: *BMC Medical Genetics*, *British Journal of Hematology*, *Medic Review* y *PLoS Genetics* y 2 en Revistas Nacionales: *Revista Temas* y *Revista Catauro*), que han ido recogiendo los resultados parciales de la investigación.

Comunicación Corta

Introducción

Las evidencias del poblamiento humano de Cuba indican que este tuvo lugar hace aproximadamente 7 000 años AP^{1,2}. Se estima que a la llegada de los españoles, existían en la isla alrededor de 112 000 habitantes³. En los primeros cincuenta años tras la Conquista, esta población se redujo dramáticamente a unos 5 000 individuos³.

Los españoles comenzaron entonces a trasladar aborígenes desde Norte América y Mesoamérica hacia Cuba, y a esclavos desde la costa occidental de África. Durante el período de la Trata fueron traídos entre 700 000 y 1 300 000 esclavos^{4,5}. La

inmigración española por su parte, se mantuvo constante desde finales del Siglo XV hasta la primera mitad del Siglo XX. Los documentos históricos indican que la mayoría de los inmigrantes españoles fueron hombres (60%-85%) y que las relaciones de pareja de hombres españoles con mujeres indígenas y luego africanas, comenzaron a ocurrir desde las primeras etapas de la colonización de la isla³.

La historia del mestizaje étnico que por casi cinco siglos tuvo lugar entre esos tres grupos originarios (Nativos Americanos, Europeos y Africanos), ha modelado la estructura genética de la población cubana actual. El Censo Nacional de Población de Cuba clasifica a los individuos según el color de la piel en: Blancos, Mestizos y Negros⁶. Este trabajo presenta los resultados de un análisis del mestizaje étnico de 1 019 individuos cubanos de las 15 provincias del país y el municipio Isla de la Juventud, utilizando un panel de 128 marcadores genéticos informativos para el origen ancestral que permitió determinar las proporciones de la mezcla étnica y su patrón de distribución geográfica. Adicionalmente se genotiparon marcadores en el ADN mitocondrial y el cromosoma Y para caracterizar el mestizaje a través de los linajes maternos y paternos. Finalmente se realizó un estudio de asociación alélica utilizando 16 marcadores genéticos ubicados en genes relacionados con la pigmentación para evaluar su relación con medidas cuantitativas de pigmentación de la piel.

La investigación constituye un estudio de relevante importancia por las siguientes razones: la distribución de las proporciones del mestizaje étnico de la población cubana actual es de importancia desde una perspectiva antropológica y también para el diseño de estudios de asociación alélica que se propongan evaluar la predisposición genética para cualquier enfermedad mediada por el origen étnico (en ese sentido este es el estudio más extenso realizado hasta hoy, en términos de tamaño y representatividad de la muestra); la caracterización de marcadores genéticos uniparentales (en el ADN mitocondrial y cromosoma Y) revela la direccionalidad del flujo génico intergeneracional que ha dado lugar a la estructura genética de la población cubana actual; y por último este es el primer estudio que se ha planteado conocer los genes que están relacionados con la pigmentación de la piel en individuos cubanos.

Material y Método

El diseño muestral fue realizado sobre la base de características demográficas de la población cubana en términos de: densidad de población por provincias, edad, género, color de piel y área de residencia rural/urbana. Se seleccionaron 1 229 viviendas en 137 de los 168 municipios del país a través de un muestreo probabilístico por conglomerados cuatrietápico con estratificación de las unidades muestrales. Fue posible visitar 1 182 viviendas y se utilizó, en cada una, la tabla de Kish para asegurar la selección del participante de la forma más aleatoria posible. 1 031 personas dieron su consentimiento para participar en el estudio. Debido a dificultades con la calidad del ADN, 12 muestras fueron excluidas del análisis de los resultados finales. A través de un cuestionario y de la realización de examen físico se recogió información de cada participante, sus padres y abuelos sobre: lugar de nacimiento, nivel educacional, hábitos y condiciones de vida, salud física, trastornos mentales, factores de riesgo para

enfermedades crónicas no transmisibles, mediciones antropométricas y muestra de sangre para el estudio de ADN.

El color de la piel fue clasificado de manera independiente por dos vías: a partir de la definición del propio individuo, y por un único investigador entrenado que clasificó a todos los individuos provincia a provincia. La concordancia entre ambas clasificaciones fue evaluada utilizando los coeficientes *kappa* de Cohen, Cicchetti-Allison y Fleiss-Cohen⁷⁻⁹. El contenido de melanina de la piel fue medido mediante un reflectómetro de banda estrecha (*DSM II ColorMeter, Cortex Technology*)¹⁰. Este instrumento provee datos cuantitativos de los niveles de melanina en piel (índice de melanina). Las mediciones fueron realizadas en la cara interna del brazo derecho en un área no expuesta al sol (pigmentación constitutiva) y en el dorso de la mano del mismo miembro, un área substancialmente expuesta a las radiaciones solares (pigmentación facultativa).

Se genotiparon 128 marcadores de ADN en regiones autosómicas que son informativos para el origen ancestral (AIMs) distribuidos por todo el genoma, utilizando la plataforma de genotipado *SequenomMassARRAY*. Los marcadores fueron seleccionados a partir de los más informativos para estudios de mestizaje en poblaciones latinas¹¹. En el caso de los marcadores de ADN mitocondrial y Cromosoma Y, fueron utilizados 18 marcadores de polimorfismos de nucleótidos de simple cadena (SNPs) para el ADN mitocondrial seleccionados del panel publicado por Álvarez- Iglesias y cols¹²⁻¹³. La definición de los haplogrupos se realizó utilizando como referencia el *worldwide mtDNA phylogeny* (mapa filogenético internacional basado en el ADN mitocondrial) y la Secuencia de Referencia Reconstruida del Homo Sapiens¹⁴. Se analizaron 12 marcadores seleccionados para el cromosoma Y, y los haplotipos fueron agrupados siguiendo la nomenclatura del Consorcio Internacional para el Cromosoma Y¹⁵⁻¹⁶.

Se utilizó el programa *ADMIXMAP* v3.8, mediante el cual se estimaron las proporciones del mestizaje en cada individuo y para el análisis de asociación alélica de los genes pigmentarios. Estadígrafos como las correlaciones de Pearson, el test de Spearman *rho*, el análisis de varianza de una y dos vías, y el test exacto de Fisher fueron utilizados a través de los paquetes *Statistic* v7.0 y *SPSS* v20.0 para evaluar las relaciones entre las proporciones individuales del mestizaje y las restantes variables estudiadas. El estudio fue aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

Resultados

La edad promedio de los participantes fue 49.35 años (mínimo 18; máximo 95; DS 16.59) y el 58% correspondió al sexo femenino. El 77% de los individuos estudiados procedía de áreas urbanas y el 23% de áreas rurales. Los participantes auto-clasificaron su color de piel en el 55% de los casos como “blancos”, 33% “mestizos” y 12% “negros”. Al estimar las proporciones del mestizaje utilizando el programa *ADMIXMAP*, los resultados indicaron que como promedio el 72% de los genes procede de ancestros Europeos (con un rango desde un mínimo de 4.3% a un máximo de 98.2%), el 20% de ancestros Africanos (0.8% a 95.2%) y el 8% de Nativos Americanos

(0.4 a 34%). Por provincias del país, la proporción de genes Europeos se distribuye desde 51% en Santiago de Cuba hasta 84% en Mayabeque, el porcentaje promedio de genes Africanos va de un 11% en Mayabeque y Sancti Spíritus hasta un 40% en Guantánamo y la proporción de genes ancestrales Nativo Americanos desde un 4% en Matanzas hasta un 15% en Granma.

Existen diferencias estadísticamente significativas en las proporciones del mestizaje entre las provincias (ANOVA: Africanos $F=11.54$, $P< 0.001$; Nativo Americanos $F=13.06$, $P<0.001$). Los tests *post hoc* indicaron que estas diferencias para las proporciones de genes de origen africano están determinadas por las provincias Guantánamo y Santiago de Cuba con un 40% y 39% como promedio respectivamente; mientras que en el caso de genes de ancestros Nativo Americanos también aparece un patrón en las diferencias a expensa de las provincias de Granma, Las Tunas y Holguín con porcentajes promedio de 15%, 12% y 12% respectivamente, los más elevados del país.

La clasificación del color de la piel que realizó de sí mismo cada individuo y la que realizó el investigador, no coincidieron solo en 65 de los 1019 individuos estudiados, por lo que los coeficientes utilizados para estimar la concordancia entre ambas, mostraron medidas de *kappa* que indican una excelente coincidencia. En relación con el índice de melanina, estudio que aborda por primera vez esta variable en la caracterización de la población cubana, la edad del individuo no tuvo influencia significativa en el valor de su índice de melanina en piel (M), pero sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los índices de melanina según el sexo (masculino $M=40.68+10.7$; femenino $M=39.17+9.45$; $P=0.015$). El índice promedio de melanina en la muestra fue 39,68, pero se observó una amplia variación en sus valores entre los participantes, en un rango desde 23.4 hasta 85.9. En individuos que se autodefinieron como “blancos”, el índice promedio de melanina fue de $34.06+3.70$, en los “mestizos” $41.69+6.29$ y en aquellos que se definieron como “negros” $60.59+8.87$. El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas en el índice de melanina entre los individuos agrupados según los tres colores de piel que utiliza el censo cubano. Los porcentajes promedio de genes Europeos, Africanos y Nativo Americanos en quienes se reportaron como “blancos” fueron de 86%, 6.7% y 7.8%, en los que se definieron “mestizos” fueron de 63.8%, 25.5% y 10.7% y en quienes se clasificaron como “negros” estos valores fueron de 29%, 65.5% y 5.5%. El análisis de la distribución geográfica del índice de melanina reveló que Guantánamo (GT) y Santiago de Cuba (SC) tienen los promedios más altos del país (GT: $M=47.51$, SC: $M=46.77$). Asimismo existe una correlación positiva entre el porcentaje de genes africanos de un individuo y el índice de melanina y negativa en la relación de este con el porcentaje de genes europeos.

El análisis de los marcadores del ADN mitocondrial permitió trazar un árbol filogenético evolutivo de la herencia materna en la población cubana, planteado por primera vez a partir de marcadores genéticos como resultado de este estudio. La información obtenida indica que el 34.5% de la información genética presente en el ADN mitocondrial procede de mujeres Nativo Americanas (téngase en cuenta que esta

información genética se transmite únicamente por vía materna), un 38.8% de madres Africanas y solo un 26.7% es de origen Euroasiático. Los porcentajes promedios de información ancestral Euroasiática transmitida por esta vía es más elevado en las provincias Matanzas (58%), Artemisa (53%) y Pinar del Río (49%) y más bajo en Santiago de Cuba (6%), Granma (7%) y Holguín (7.5%). Las proporciones más altas de genes Africanos por vía materna se encuentran en las provincias de Santiago de Cuba (59%) y Granma (52%) y las más bajas en Las Tunas (21%) y Camagüey (24%). Con respecto a los porcentajes de genes Nativo Americanos vía materna, los valores más elevados se encontraron en Holguín (59%) y Las Tunas (58%) y los más bajos en Matanzas, Cienfuegos y Pinar del Río con un 13% en cada caso. El estudio de los marcadores del cromosoma Y permitió igualmente trazar el árbol filogenético cubano por vía paterna. Se apreció que el 81.8% de la información por vía paterna corresponde a genes de ancestros Euroasiáticos, el 17.7% procede de padres Africanos y el 0.5% de ancestros Nativo Americanos. Este último hallazgo es muy significativo e indica que dos individuos de los estudiados, proceden de progenitores indígenas, algo muy raramente encontrado en las actuales poblaciones del Caribe. Las contribuciones paternas de origen Euroasiático, más elevadas, fueron encontradas en Matanzas y Pinar del Río, mientras que en caso de la de origen Africano, fue más alta en la provincia Santiago de Cuba con respecto al resto del país.

La presente investigación es a su vez el primer estudio que aborda los genes relacionados con la pigmentación de la piel en individuos cubanos. De los 15 genes estudiados, dos de ellos, el gen *SLC24A5* y el *SLC45A2*, mostraron asociación estadísticamente significativa con el índice de melanina de los participantes. Este estudio reveló que en el caso de la muestra cubana, por cada copia del alelo A del marcador rs1426654 ubicado en el gen *SLC24A5* que posee un individuo, el índice de melanina disminuye en 5.04 unidades y su piel es menos oscura. En el caso del marcador rs16891982 ubicado en el gen *SLC45A2*, por cada copia de su alelo G que posea un individuo, el índice de melanina decrece en 3.04 unidades. Es la primera vez que una investigación determina la relación directa entre la presencia de un genotipo dado con el índice de melanina y por consiguiente la pigmentación de la piel, en una muestra de población cubana.

Conclusiones

El estudio combinado de marcadores genéticos autosómicos y uniparentales en una amplia muestra de individuos cubanos de todas las provincias, ha permitido identificar por primera vez los patrones de distribución geográfica del mestizaje étnico de nuestro país.

Al comparar los resultados obtenidos con ambos grupos de marcadores, es posible distinguir con toda precisión cómo se ha producido durante poco más de cuatro siglos, un flujo génico sesgado por el sexo, que se traduce en que la contribución paterna a la proporción de genes de origen Euroasiático presentes en la población cubana actual es mayor que la contribución materna y por el contrario, la contribución materna al porcentaje de genes Africanos y Nativo Americanos encontrado en el estudio es mayor que la contribución por vía paterna. Estos patrones son consistentes con lo que ha sido descrito en las investigaciones históricas y arqueológicas en nuestro país. Finalmente,

hemos establecido por vez primera evidencias de que los genes *SLC24A5* y el *SLC45A2* están significativamente asociados con la pigmentación de la piel en individuos cubanos.

Referencias

- [1] Rodríguez Suárez R, Arredondo C, Rangel A, Martínez JG, Chinique de Armas Y, et al. (2009). Aportes a la arqueología y la antropología física de Cuba y Las Antillas: sitio arqueológico Canimar Abajo, Matanzas, Cuba. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.
- [2] Lalueza-Fox C, Gilbert MTP, Martínez-Fuentes AJ, Calafell F, Bertranpetit J (2003) Mitochondrial DNA from Pre-Columbian Ciboneys from Cuba and the prehistoric colonization of the Caribbean. *Am J Phys Anthropol* 121: 97-108.
- [3] Guanache, J (2011) Componentes étnicos de la nación cubana. La Habana: Editorial Ciencias Sociales. 130 p.
- [4] Curtin PD (1969) *The Atlantic slave trade: a census*. Madison: The University of Wisconsin Press. 358 p.
- [5] Pérez de la Riva, J (1979) *El monto de la inmigración forzada en el siglo XIX*. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Sociales. 47 p.
- [6] Alfonso León, A (2009) *La medición del color de la piel en los censos de población y viviendas*. La Habana: Oficina Nacional de Estadísticas. CEPDE.
- [7] Cohen J (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 20:37-46.
- [8] Cicchetti DV, Allison T (1971). A new procedure for assessing reliability of scoring EEG sleep recordings. *Am J EEG Technol* 11:101-109.
- [9] Fleiss JL, Cohen J. (1973) The equivalence of weighted kappa and the intraclass correlation coefficient as measures of reliability. *Educ Psychol Meas* 33:613-619.
- [10] Shriver MD, Parra EJ (2000) Comparison of narrow-band reflectance spectroscopy and tristimulus colorimetry for measurements of skin and hair color in persons of different biological ancestry. *Am J Phys Anthropol* 112: 17-27.
- [11] Galanter JM, Fernández-Lopez JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernández-Rozadilla C, et al. (2012) Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. *PLoS Genet* 8:e1002554.
- [12] Álvarez-Iglesias V, Mosquera-Miguel A, Cerezo M, Quintáns B, Zarrabeitia MT, et al. (2009) New population and phylogenetic features of the internal variation within mitochondrial DNA macro-haplogroup R0. *PLoS One* 4:e5112.
- [13] Álvarez-Iglesias V, Jaime JC, Carracedo A, Salas A (2007) Coding region mitochondrial DNA SNPs: targeting East Asian and Native American haplogroups. *Forensic Sci Int Genet* 1:44-55.
- [14] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, et al. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23:147.
- [15] Brión M, Sanchez JJ, Balogh K, Thacker C, Blanco-Verea A, et al. (2005) Introduction of an single nucleotide polymorphism-based "Major Y-chromosome haplogroup typing

kit" suitable for predicting the geographical origin of male lineages. Electrophoresis 26:4411-44120.

- [16] Blanco-Verea A, Jaime JC, Brión M, Carracedo A (2010)Y-chromosome lineages in native South American population. Forensic Sci Int Genet 4:187-193.