

**Variabilidad del VNTR D1S80 en
descendientes de vascos del Uruguay y su
utilidad como marcador genético
poblacional**

Analía Menéndez

Tutor: Pedro Hidalgo

Co-tutor: Gonzalo

Figueiro

Laboratorio de Antropología

Biológica

FHCE-UdelaR

Montevideo, 12 de Diciembre del 2013

Resumen

Las repeticiones en tándem (VNTR) pueden ser usadas como marcadores genéticos para la identificación individual y estudios de la caracterización genética de poblaciones, ya que presentan un gran número de alelos, con una mucha variabilidad genotípica interindividual. Esta investigación analiza el minisatélite D1S80, localizado en el brazo corto del cromosoma 1, que consta de repeticiones de 16 pb, y es uno de los VNTR más empleados en estudios poblacionales y forenses. Las variantes alélicas se determinan según el número de repetidos, que van desde 15 a 41.

Este estudio se encuentra enmarcado en una investigación multidisciplinaria comenzada en 2004 por el Departamento de Antropología Biológica (FHCE – UdelaR), en conjunto con la asociación de descendientes de vascos Haize Hegoa. Se empleó el marcador D1S80 a fin de estudiar 4 muestras poblacionales: 2 muestras de descendientes de vascos (de Trinidad y Montevideo), y 2 muestras que ofician como control carente de antepasados vascos conocidos.

La metodología consistió en estandarizar un método de genotipado del *locus* D1S80, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la visualización de los productos de amplificación en geles de poliacrilamida con tinción por plata. Los datos genotípicos y alélicos obtenidos, fueron analizados a dos escalas. Para estudiar la eventual subdivisión poblacional de esta muestra se aplicó el test de equilibrio de Hardy-Weinberg, estadísticos F y análisis de la varianza molecular (AMOVA). Los resultados de dichos análisis indican que las 4 muestras en estudio se comportan como una población única. A una mayor escala se estudió la similitud de las frecuencias alélicas de las muestras con respecto a diversas poblaciones europeas, amerindias y africanas, mediante un análisis de componentes principales. Del diagrama de dispersión, según los patrones y agrupaciones obtenidas, se pudo concluir que las muestras uruguayas se agrupan entre las europeas y las indígenas, sin relación con las africanas. Particularmente los descendientes de vascos de Trinidad tienen un patrón desviado del resto de las uruguayas hacia las europeas, lo que muestra que aún se conserva un cierto sesgo genético hacia su población de origen. Por último, para analizar el potencial de este marcador en la identificación individual y estudios forenses, se calculó el índice de probabilidad de identidad. Este índice indica una capacidad de discriminación individual aceptable para la población uruguaya.

Palabras clave: genética de poblaciones humanas, minisatélites, Uruguay.

Introducción

El genoma humano contiene aproximadamente 3.000 millones de pares de bases que se encuentran distribuidas en 23 cromosomas. De estos, solo el 3% lo constituyen secuencias codificantes de proteínas (Kass y Batzer 2001) donde se codifican, por lo menos, entre 20.000 y 25.000 proteínas (Naidoo et al. 2011), mientras que el resto lo conforman regiones intergénicas y secuencias repetidas de función no establecida (Kass y Batzer 2001). Las secuencias repetidas forman parte de aproximadamente el 50% del total del genoma (Näslund et al. 2005), son las regiones más complejas y pueden ser o no funcionales (Kass y Batzer 2001). Un tipo de estas, son las secuencias repetidas en tándem (Näslund et al. 2005), que se clasifican, según la longitud del motivo repetido, en microsatélites (hasta 15 pares de bases), minisatélites (de 15 a 100 pares de bases) y macrosatélites (más de 100 pares de bases) (Kass y Batzer 2001).

Jeffreys et al. (1985) describen los primeros minisatélites en el genoma humano. Estas secuencias se encuentran distribuidas en toda la extensión de los cromosomas (Tarantul 2010), pero se localizan principalmente en las regiones subteloméricas y centroméricas (Näslund et al. 2005). Los minisatélites pueden presentarse como monomórficos o polimórficos, es decir, con variación en el número de repeticiones en una población (Näslund et al. 2005). Concretamente, en genética de poblaciones, se define como polimorfismo genético a la presencia en una población de dos o más alelos en un *locus*, cada uno con una frecuencia apreciable, bien sea en forma estable o transitoriamente (Cavalli-Sforza y Bodmer 1971).

Los minisatélites polimórficos se denominan *variable number of tandem repeats* (VNTRs), y pueden ser usados como marcadores genéticos para la identificación individual y estudios poblacionales, por presentar un gran número de alelos y por tener una gran variabilidad genotípica interindividual e interpoblacional (Budowle et al. 1991). Secuencias de este tipo fueron empleadas para las primeras etapas de mapeo del genoma humano (Denoëud et al. 2003). Además, los minisatélites pueden cumplir roles importantes en el genoma, ya sea regulando la expresión de algunos genes, como moduladores transcripcionales o aumentando la estabilidad de los ARNm y con ello la eficiencia de traducción (Denoëud et al. 2003). Por ejemplo, se encontró una relación entre diferentes alelos de un VNTR cercano en secuencia al gen de la insulina, y la expresión del ARNm de este gen; es decir, en presencia de determinados alelos de este VNTR, se observa una mayor expresión del ARNm de la insulina, mientras que con otros alelos, la expresión es menor. Se ha encontrado una asociación entre los alelos vinculados a una menor expresión de la insulina y la diabetes tipo I (Vafiadis et al. 1997).

Aún no existe consenso sobre los mecanismos que provocan la gran variación individual en el número de repeticiones en tándem para los VNTRs, pero se observó que la inestabilidad que presentan se debe a diversos mecanismos que ocurren durante la replicación y la recombinación del genoma. Existen dos modelos generales que intentan explicar la generación de variabilidad de los minisatélites (Richard y Paques 2000). Un modelo es propuesto por Jeffreys et al. (1988), quienes intentaron explicar la diversidad en el número de repetidos en tándem mediante un mecanismo de recombinación recíproca. Por una parte propusieron que la ganancia o pérdida de pocos repetidos (4 a 10) se daba por un mecanismo de *slippage* durante la replicación meiótica. Este mecanismo, también denominado recombinación por *copy-choice*, plantea que la ADN polimerasa sufre una detención y disociación después de copiar el tramo de repetidos en tándem. A su vez, la nueva hebra recién sintetizada también se disocia de su molde, y cuando se rehibrida para continuar la copia, lo hace con otro sector de los repetidos de la hebra molde. A continuación, la ADN polimerasa se reasocia para continuar sintetizando, lo que da como resultado una hebra nueva recién sintetizada que contiene mayor o menor cantidad de repetidos (Viguera et al. 2001). Por otra parte, Jeffreys et al. (1988), también propusieron que la ganancia o pérdida de un fragmento de ADN de mayor tamaño (200 repetidos o más), se debe a un proceso de recombinación meiótica, promovido por secuencias que presentan mayor frecuencia de recombinación (denominadas secuencias *hot spot*) flanqueantes al minisatélite (Sajantila et al. 1992).

Otro modelo, más reciente, explica la variabilidad a través de un mecanismo de conversión génica (también denominada recombinación no recíproca) (Richard y Paques 2000), que se basa en la fragilidad que presentan algunos minisatélites humanos (Sutherland et al. 1998) de sufrir una rotura de la doble hebra. Richard y Paques (2000) sugieren entonces, que si esto ocurre durante la mitosis o meiosis, se podría producir un proceso de expansión o contracción. Cuando se intenta reparar la molécula de ADN rota, se utiliza como molde una secuencia donante homóloga con los mismos repetidos en tándem. La hebra a repararse invade la hebra molde y se aparea con esta para continuar su síntesis. Este apareamiento puede darse en otro sector de los VNTRs y provocar así la contracción o el alargamiento de la secuencia, y por lo tanto del número de repetidos.

En esta investigación se analizó el minisatélite D1S80, localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.32, número de acceso GenBank #D28507; figura 1), que consta de repeticiones de 16 pb (Verbenko y Limborska 2007), y es uno de los dos VNTR más empleados en los estudios poblacionales y forenses, junto con el minisatélite 3´APOB (Fusté 2012). Una de las características que permite emplear este marcador para esta finalidad es su herencia mendeliana (Sajantila et al. 1992), lo que permite que pueda ser usado para realizar estudios de

paternidad (Helminen et al. 1992; Sciacca et al. 2004). A 16,5 kb corriente abajo del sitio de localización de D1S80 en el cromosoma, se encuentra el primer exón de una subunidad de la fosfolipasa C (Verbenko y Limborska 2007), una enzima que regula la liberación de reservas de Ca^{++} intracelular mediante un segundo mensajero (Smrcka y Sternweis 1993). A pesar de esta cercanía, sin embargo, no se ha observado desequilibrio de ligamiento entre estos dos *loci* (Verbenko y Limborska 2007), y por esto, se puede descartar un posible papel regulatorio de este minisatélite sobre la expresión de este gen.

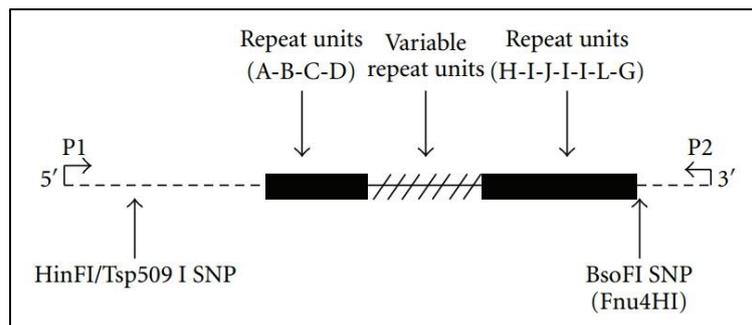


Figura 1: estructura general del *locus* D1S80. Los repetidos A-B-C-D, ubicados en el extremo 5', y los repetidos H-I-J-I-I-L-G, ubicados en el extremo 3' son constantes; los repetidos variables se encuentran en el medio. El cebador directo empleado en este trabajo se ubica en la región P1, que consiste en un motivo flanqueante de 132 pb. El cebador reverso empleado en este trabajo se ubica en la región flanqueante P2 que tiene una longitud de 32 pb (Balamurugan et al. 2012).

Las variantes alélicas se determinan según el número de repetidos. Para el D1S80 el número de repetidos puede ser de 15 a 41, o más de 41, pero esta cantidad dificulta su visualización y correcta determinación genotípica (Verbenko y Limborska 2007).

Basado en varios estudios (Fusté 2012) se concluyó que el D1S80 puede ser usado para diferenciar claramente entre los grandes grupos continentales e identificar las peculiaridades de las poblaciones individuales; y junto con otros marcadores genéticos, puede contribuir a descifrar aspectos de la trayectoria de la evolución de la población, de acuerdo al segmento del genoma en el que se encuentren, donde cada cual tendrá su propia historia evolutiva.

En el inicio de las investigaciones de los VNTRs, la técnica más empleada para el análisis de los polimorfismos era el RFLP (Helminen et al. 1992; Arakura et al. 1998) (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, técnica que consiste en la digestión con enzimas de restricción de un fragmento de ADN), y la posterior visualización de los productos mediante la técnica de *Southern blot* o en un gel de electroforesis. Luego esta metodología se sustituyó por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por ser una técnica menos costosa y más rápida (Budowle et al. 1991; Sajantila et al. 1992; Arakura et al. 1998; Vergnaud y Denoeud 2000).

En este trabajo se presenta la estandarización de un método de genotipado del *locus* D1S80, empleando la reacción en cadena de la polimerasa y visualización de los productos de amplificación en geles de poliacrilamida con tinción por plata, y la valoración de su potencial para el análisis de genética de poblaciones. Este trabajo continúa además con los análisis genéticos antropológicos comenzados en 2004 de individuos autoidentificados de ascendencia vasca, residentes en Trinidad y en Montevideo. El interés en estos individuos radica en la importancia que presentan por ser uno de los primeros grupos pobladores de nuestro territorio, luego de que Montevideo fue fundada en 1724. Además, después de esto existieron dos importantes olas migratorias de individuos vascos, la francesa (1825-1842) y la española (1842-1876) (Marenales y Luzuriaga 1990), lo que aumentó la presencia de individuos descendientes de vascos en este país. Ya se obtuvieron datos de la muestra de Trinidad por el estudio del genoma mitocondrial (Sans et al. 2011), y en este caso se continúa con un estudio del genoma nuclear y el agregado de nuevas muestras para poder extraer conclusiones adicionales.

Materiales y Métodos

Muestra

Las poblaciones objetivo corresponden a dos grupos de individuos no emparentados autoidentificados como de ascendencia vasca. La primera muestra se compone de 54 individuos residentes de Trinidad (departamento de Flores, Uruguay) y forman parte de un trabajo de análisis genéticos antropológicos comenzados en 2004 (Sans et al. 2011). La segunda muestra se compone de 20 individuos residentes de Montevideo, Uruguay. Con fines comparativos se analizaron muestras de dos poblaciones que oficiaron de “control” carente de antepasados vascos conocidos: una de 16 individuos de la zona centro-sur del país y otra de 23 individuos residentes en Montevideo. El total analizado es de 113 individuos. En la figura 2 se puede apreciar la localización de las muestras en estudio. Todos los individuos dieron su consentimiento para la realización de estudios genéticos poblacionales, y fue recabada la información genealógica y familiar de los mismos.



Figura2: mapa del Uruguay con la localización de las poblaciones muestreadas. En azul, localización de las muestras control; en rojo, localización de las muestras descendientes de vascos. Imagen modificada de Sans et al. (2011).

Extracción del ADN

El ADN fue extraído de sangre mediante el método de *salting out* (Miller et al. 1988) en el caso de las muestras de Trinidad, mientras que en el resto de las muestras el ADN fue extraído de pelo mediante el método de Hidalgo et al. (2009). Las muestras fueron amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un par de cebadores definidos por Kasai et al. (1990). Se empleó 1 unidad de taq polimerasa (Dream Taq, *Fermentas*) por reacción, con el *buffer* específico que acompaña la enzima, y 3,5 mM de MgCl₂, 250 nM de cebadores y 100 μM dNTP, en un volumen total de reacción de 30 μL. También se adicionó albúmina de suero bovino (BSA), que incrementa la eficiencia de la PCR al interactuar con inhibidores de la polimerasa (Al-Soud y Rådström 2000). La dilución utilizada previamente depende del tipo de muestra de donde se extrajo el ADN: mientras que para pelo se utilizó una dilución 1:20, para sangre se utilizó una dilución 1:10. Esta diferencia radica en ajustar la mejor relación entre ADN e inhibidores de la PCR, ya que las extracciones provenientes de pelo presentan factores mayoritariamente proteicos que intervienen o inhiben la PCR, y por esto se optimizan a una mayor dilución.

Amplificación y visualización de los fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se amplificaron mediante la técnica de PCR, bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 65°C y 1 minuto a 72°C; y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El éxito de la amplificación de las muestras se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 100V, en un medio con *buffer* TBE 0,5X. Los productos de amplificación de ADN fueron visualizados bajo luz ultravioleta (UV), debido a la presencia de bromuro de etidio (EtBr) en el gel. El EtBr es un agente intercalante del ADN, que en presencia de luz UV emite luz roja, y por esto es usado para visualizar los fragmentos de ADN en el gel (Sharp et al. 1973). En las primeras etapas de la estandarización del método se realizaron amplificaciones duplicadas a fin de comprobar la repetibilidad de los genotipados.

El genotipado de las muestras se efectuó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida separador al 6% y un gel concentrador al 3%, con una relación entre acrilamida y bisacrilamida de 29:1. En el anexo I se detalla la composición del gel.

La electroforesis se efectuó a una diferencia de potencial de 80V durante 3 horas, 15 minutos, en un medio con *buffer* TBE 1X. Como referencia para el gel de poliacrilamida se utilizaron marcadores de peso molecular de ADN con bandas de 1Kb (*Fermentas*) y 123pb

(*Invitrogen*). Asimismo, se purificaron los productos de varias amplificaciones a fin de elaborar un marcador específico para este minisatélite.

El revelado de los geles de poliacrilamida se realizó mediante una técnica con nitrato de plata, siguiendo los lineamientos básicos utilizados por Sanguinetti et al. (1994). Se detalla en el anexo II.

Para realizar el genotipado, las imágenes digitalizadas de los geles de poliacrilamida fueron modificadas para quedar a la misma escala, y los tamaños de las bandas visibles fueron determinados a partir de una escala gráfica con las posiciones esperadas de los alelos previstos empíricamente (Geisser 1999).

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa *GENALEX v.6* (Peakall y Smouse 2006). Mediante esta herramienta se aplicaron los análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg, cálculo de estadísticos F y AMOVA (análisis de la varianza molecular). Por otra parte se efectuó un análisis de componentes principales (PCA) empleando el paquete estadístico Minitab 14 (Minitab inc., www.minitab.com). Además con el *GENALEX* se halló el índice de probabilidad de identidad, que estima la probabilidad de que 2 individuos extraídos al azar de una población, porten el mismo genotipo para 1 o varios *loci* (Evetts y Weir 1998).

El modelo de Hardy-Weinberg (H-W) plantea que una población lo suficientemente grande y panmíctica, es decir que se aparee al azar y no haya diferencias en las frecuencias en ambos sexos, mantiene estables sus frecuencias alélicas y genotípicas de generación en generación, lo cual se conoce como equilibrio de H-W. Esta suposición ideal se utiliza como hipótesis nula, ya que una desviación del equilibrio es un indicio de que actúan otras fuerzas sistemáticas o aleatorias. Los procesos que pueden provocar la desviación del equilibrio H-W pueden ser la selección, mutaciones, flujo génico, deriva génica y/o consanguinidad (como desviación de la panmixia) (Cabrero y Camacho 2002). Para verificar si una población se encuentra en equilibrio H-W se comparan las frecuencias genotípicas observadas en la población con las esperadas bajo el supuesto de panmixia; la correspondencia en términos estadísticos de ambas frecuencias indica que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los estadísticos F, también denominados índices de fijación, representan parámetros que se pueden expresar en términos de la diversidad génica (heterocigosidad) (Nei, 1987; Nagylaki 1998). S. Wright desarrollo este análisis considerando un *locus* con dos alelos y en equilibrio de H-W. A lo largo del tiempo diversos autores han modificado y planteado otros modelos para este análisis (Cockerham y Weir 1986; Nei y Chesser 1983 entre otros). Los

estadísticos F en un sistema jerárquico de estructura de una población se relacionan mediante la siguiente expresión: $1-F_{IT} = (1-F_{IS})(1-F_{ST})$, introducida por Wright (1943, 1951). F_{IS} representa la endogamia intrapoblacional (mide la reducción de la heterocigosidad), F_{ST} representa la subdivisión interpoblacional (mide la divergencia genética entre subpoblaciones a través del efecto Wahlund), y F_{IT} mide la endogamia total (Nei 1977). Los estadísticos F pueden utilizarse como una medida de la diversidad génica intra e interpoblacional, que se ve representada por la heterocigosidad.

El análisis de la varianza molecular, o AMOVA (Excoffier et al. 1992), es una modificación del análisis de la varianza, o ANOVA (Miller 1997), que introduce información molecular derivada de los análisis de datos genéticos. Además AMOVA puede ser adaptable a información proveniente de diferentes análisis moleculares, orígenes y condiciones, obteniéndose la diferenciación genética entre las muestras de las poblaciones. El AMOVA se basa en permutaciones, y no asume una distribución normal, lo que permite utilizar diferentes asunciones evolutivas (Mengoni y Bazzicalupo 2002). En este trabajo se utilizó el AMOVA planteando tres posibles agrupaciones de poblaciones. En una agrupación se incluyen ambas poblaciones control como parte de un grupo, y ambas poblaciones descendientes de vascos como parte de otro grupo; en otra agrupación se incluyen los individuos residentes en Montevideo en un grupo y los residentes en el interior en otro, y por último se incluyen los individuos descendientes de vascos de Trinidad como un grupo separado del resto. La finalidad de este análisis era explorar eventuales agrupaciones poblacionales que pudieran quedar enmascaradas en el análisis general de estadísticos F. El razonamiento básico detrás de este análisis es que la agrupación que mejor se corresponda con los patrones de flujo génico entre las poblaciones estudiadas resultará en una minimización de la variación intrarregional y una maximización de la variación interregional.

El análisis de Componentes Principales (PCA) es un método multivariado que analiza la covariación entre variables, es decir, reúne variables con un factor común, transformándolas en un menor número de variables ortogonales que sustituyen a las originales (Dunteman 1989). Los componentes principales obtenidos son nuevas variables que se representan en tantas dimensiones como cantidad de componentes principales haya. Es deseable que los primeros tres componentes expliquen aproximadamente el 75% de la variación de los datos originales. Las relaciones entre los sujetos o casos estudiados se pueden visualizar en un gráfico de dispersión, donde los ejes representan los primeros 2 o 3 componentes principales (Shennan 1992). En este trabajo las variables empleadas son las frecuencias de cada alelo, mientras que los casos son las muestras analizadas y varias poblaciones de referencia extraídas de la literatura (tabla 1, frecuencias incluidas en anexo III). El criterio utilizado para la selección de las poblaciones de

referencia se vincula con la historia de la población uruguaya: los datos genético-poblacionales actuales indican que la población uruguaya, a pesar de tener una mayoría de ascendencia europea, presenta componentes genéticos atribuibles a un origen africano (6%) e indígena (10%) (Hidalgo et al. 2005; Sans 2009). Por lo tanto para poder visualizar la relación de nuestra muestra con otras poblaciones, se consideró conveniente incluir tanto poblaciones indígenas americanas relativamente aisladas, así como poblaciones europeas, particularmente del área Mediterránea. Se incluyó así mismo una muestra del África subsahariana en el análisis comparativo.

Región	N° de individuos	Bibliografía
Italia del Sur	206	Mastana et al. 2000
España (Valencia)	115	Mastana et al. 2000
España (Cataluña)	183	Mastana et al. 2000
España (Galicia)	149	Mastana et al. 2000
España (Madrid)	203	Mastana et al. 2000
Portugal del Norte	227	Pinheiro et al. 1996
Francia	110	Mastana et al. 2000
Africanos	101	Peterson et al. 2000
Yanomama	25	Da Silva et al. 1999
Kayapo	26	Da Silva et al. 1999
Xavante	50	Heidrich et al. 1995
Zoro	50	Heidrich et al. 1995
Surui	48	Hutz et al. 1997

Tabla 1: poblaciones de referencia utilizadas para el análisis de componentes principales, se indica el número de individuos analizados y su autor.

Resultados

Genotipado de las muestras

El genotipado de las muestras se realizó a través de un gel de poliacrilamida al 6%, como se mencionó en Materiales y Métodos. En la figura 3 se puede apreciar un ejemplo de un gel utilizado para los genotipados. En el anexo IV se encuentran tabulados los genotipos de todas las muestras.

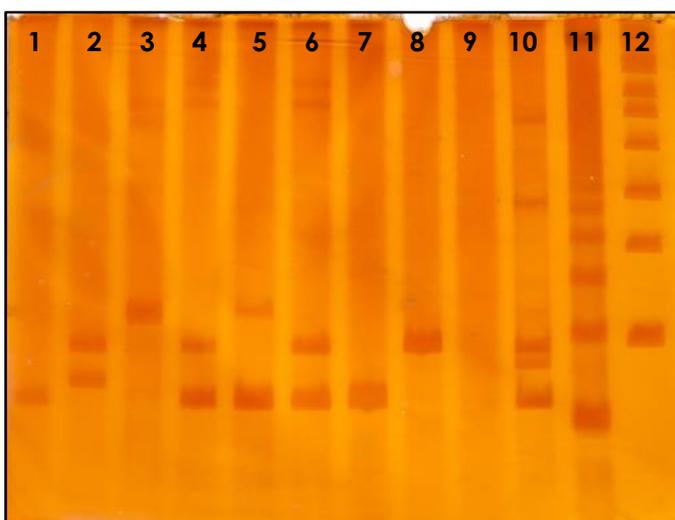


Figura 3: gel de poliacrilamida al 6%. Carriles 1-8: muestras con diferentes genotipos, carril 9: control negativo (H₂O), carril 10: marcador específico para D1S80, carril 11: marcador de peso molecular de 123pb, carril 12: marcador de peso molecular de 1Kb.

El marcador específico para D1S80 (figura 3, carril 10), realizado a partir de la purificación de los productos de varias amplificaciones, reflejó los alelos predominantes en la población estudiada.

Análisis de los datos

En el genotipado de las muestras no se pudo distinguir entre los alelos 22 y 23 (es decir, entre 22 y 23 repetidos); por lo tanto, para el análisis de los resultados, se los trata como un único alelo con la denominación “22, 23”. Los alelos mayores a 31 repetidos también se consideran como únicos, debido a que son extremadamente infrecuentes en las poblaciones en estudio.

Test de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)

En la tabla 2 se aprecian los resultados del test de equilibrio de H-W de las cuatro poblaciones en estudio. Según estos resultados, la única población que no está en equilibrio de

H-W, es la población 1 (muestra de descendientes de vascos nacidos y residentes en Montevideo).

Población	GL	Chi ²	Prob	Signif
1 (vascos Mdeo.)	28	56,884	0,001	**
2 (controles Mdeo.)	28	25,507	0,600	ns
3 (vascos Trinidad)	78	76,603	0,524	ns
4 (controles Trinidad)	15	24,244	0,061	ns

Tabla 2: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg aplicado a las cuatro muestras en estudio (Pop 1 a Pop 4) correspondientes a vascos Mdeo., controles Mdeo., vascos Trinidad y controles Trinidad, respectivamente. ns=no significativo, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

En las figuras 4, 5, 6 y 7 se observan las diferencias entre las frecuencias esperadas y observadas de los genotipos en cada población de acuerdo a las expectativas del equilibrio de H-W. En la muestra de vascos de Montevideo se observan como genotipos más frecuentes el 18/18, 18/24, 24/24 y 25/25; mientras que para la muestra de controles de Montevideo son el 18/18, 18/24 y 24/24. Para los vascos de Trinidad los genotipos más frecuentes son el 18/24, 21/24, 18/18 y 22/22; mientras que para los controles de esta muestra son el 18/18, 22/22, 18/24 y 24/24.

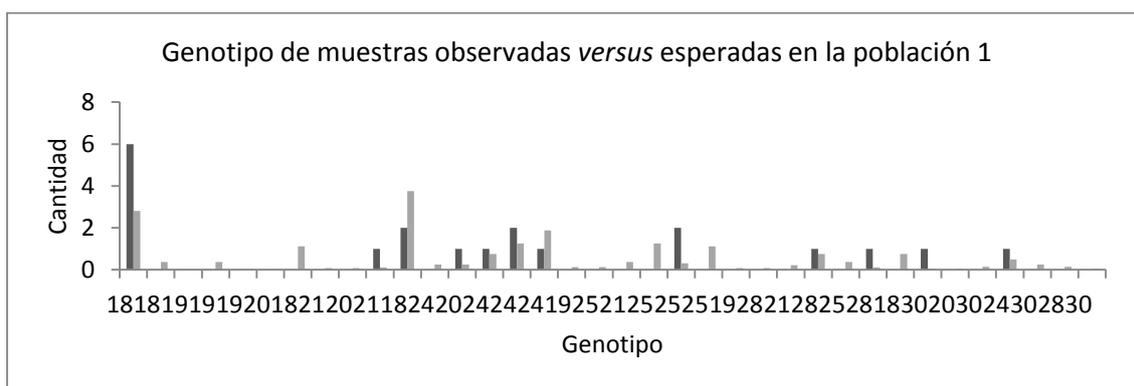


Figura 4: representación gráfica de los genotipos observados (gris oscuro) versus los esperados (gris claro) en la población 1 (vascos Mdeo.). El alelo 22 designa al conjunto de los alelos 22 y 23.

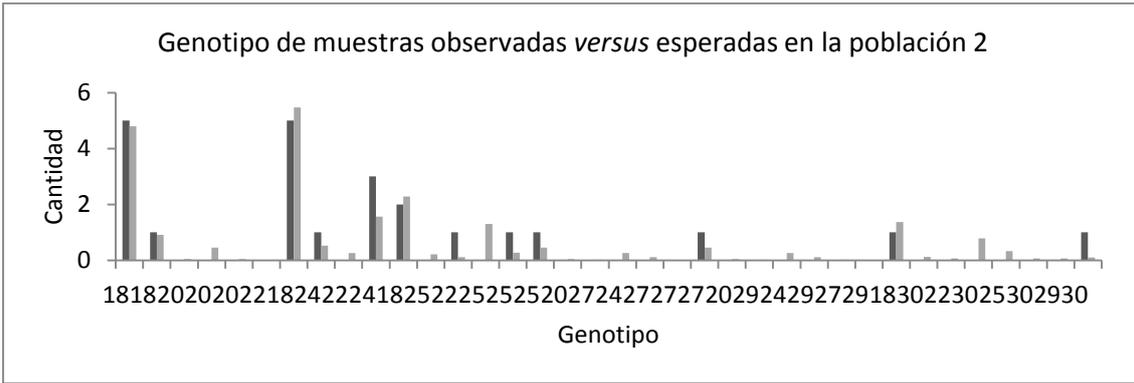


Figura 5: representación gráfica de los genotipos observados (gris oscuro) *versus* los esperados (gris claro) en la población 2 (controles Mdeo.). El alelo 22 designa al conjunto de los alelos 22 y 23.

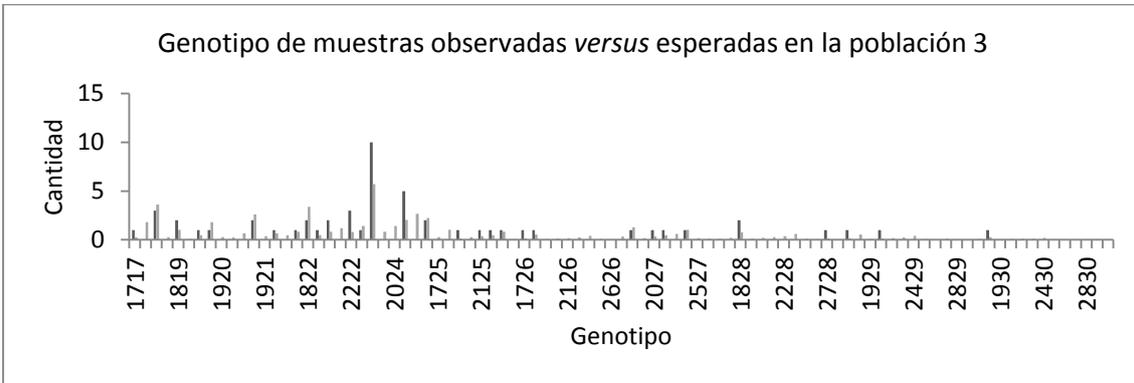


Figura 6: representación gráfica de los genotipos observados (gris oscuro) *versus* los esperados (gris claro) en la población 3 (vascos Trinidad). El alelo 22 designa al conjunto de los alelos 22 y 23.

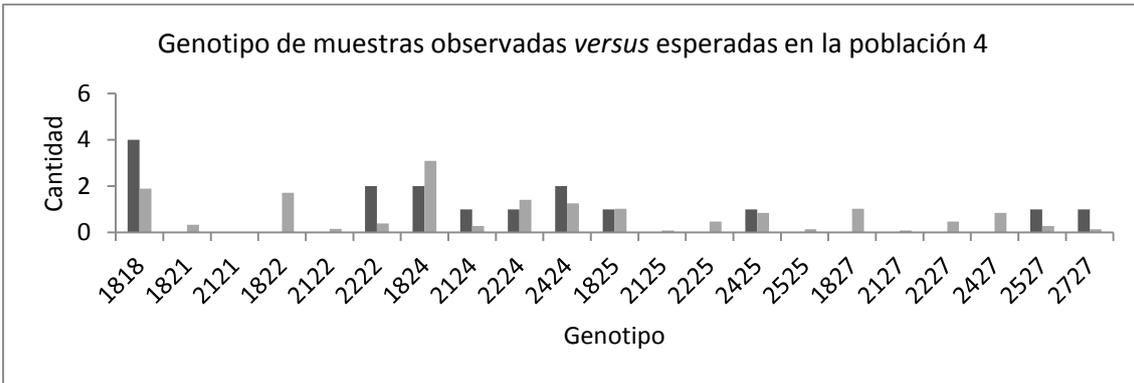


Figura 7: representación gráfica de los genotipos observados (gris oscuro) *versus* los esperados (gris claro) en la población 4 (controles Trinidad). El alelo 22 designa al conjunto de los alelos 22 y 23.

Frecuencias alélicas

Se identificaron 14 alelos diferentes entre las cuatro poblaciones en conjunto, los cuales no se ven representados en todas ellas. Para el caso de la población 1 (vascos Montevideo) y la

población 2 (controles de Montevideo) se ven representados 8 alelos, para la población 3 (vascos Trinidad) 13 alelos y por último para la población 4 (controles Trinidad) 6 alelos. En la tabla 3 se encuentran las frecuencias alélicas para cada población, y en la figura 8 se representan gráficamente las mismas. Se observa una distribución bimodal con sus frecuencias máximas en los alelos 18 y 24.

Alelos	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4
N° indiv.	20	23	54	16
17	0,000	0,000	0,065	0,000
18	0,375	0,457	0,259	0,344
19	0,025	0,000	0,037	0,000
20	0,025	0,043	0,065	0,000
21	0,075	0,000	0,093	0,031
22, 23	0,000	0,022	0,120	0,156
24	0,250	0,261	0,204	0,281
25	0,125	0,109	0,037	0,094
26	0,000	0,000	0,019	0,000
27	0,000	0,022	0,046	0,094
28	0,075	0,000	0,028	0,000
29	0,000	0,022	0,019	0,000
30	0,050	0,065	0,009	0,000

Tabla3: frecuencias alélicas de las cuatro muestras en estudio.

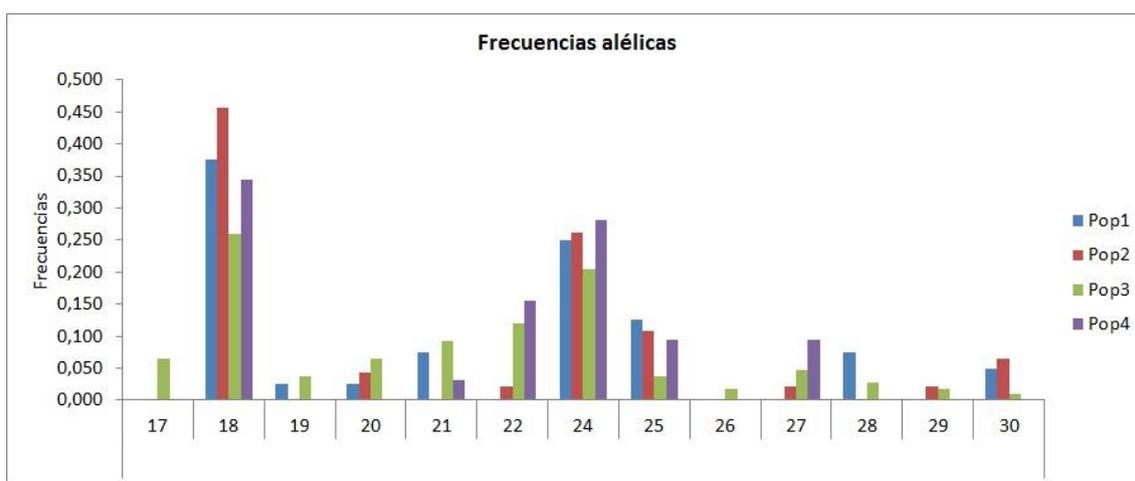


Figura 8: representación gráfica de las frecuencias alélicas de las cuatro muestras en estudio.

Heterocigosidad y Estadísticos F

En la tabla 4 se muestran los valores de heterocigosidad esperada y observada para cada población. En todos los casos la heterocigosidad esperada es mayor que la observada. Para las poblaciones 1 y 4 la heterocigosidad esperada es de casi el doble (91% y 74% mayor respectivamente), mientras que para la población 2 es un 24% mayor, y para la población 3 solamente un 2% mayor. El índice F de endogamia más bajo se encuentra por ende en la población 3, siendo intermedio para la población 2 y presentando los mayores valores en las poblaciones 1 y 4.

En la tabla 5 se muestran los índices de fijación para las poblaciones en su conjunto. El F_{ST} es bajo (su valor es de 0,022) comparado con el F_{IS} (0,275) y el F_{IT} (0,291).

Pop	N	Ho	He	F
Pop1	20	0,400	0,766	0,478
Pop2	23	0,565	0,704	0,197
Pop3	54	0,833	0,853	0,024
Pop4	16	0,438	0,760	0,424

Tabla 4: Heterocigosidad observada (Ho), Heterocigosidad esperada (He), índice de endogamia (F), para las 4 poblaciones en estudio.

F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
0,275	0,291	0,022

Tabla5: Índices de Fijación (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}) para todas las poblaciones.

Análisis de la varianza molecular -AMOVA-

Como ya fue comentado en materiales y métodos, Para este análisis se realizan 3 agrupaciones diferentes con las 4 muestras en estudio, con el fin de establecer con mayor precisión las relaciones genéticas entre ellas. Se pueden apreciar los porcentajes de varianza molecular entre las regiones (agrupaciones elegidas), dentro de las regiones, entre los individuos y dentro de los individuos (heterocigosidad) para las 3 agrupaciones por separado en las figuras 9, 10 y 11. Cabe destacar que los porcentajes de varianza molecular entre las regiones y dentro de las regiones son muy bajos para los 3 casos (van desde 0 a 2%). En 2 agrupaciones (vascos Trinidad *versus* las muestras restantes, y Montevideo *versus* el interior) existe un mayor porcentaje de división interregional (2%). Los porcentajes relativos a los individuos prácticamente no varían entre las distintas agrupaciones.

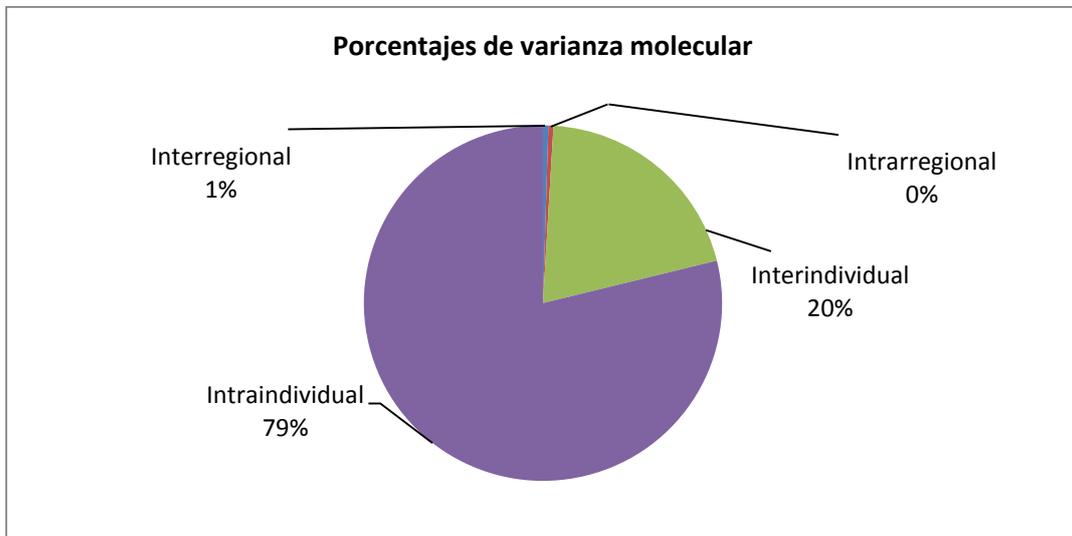


Figura 9: representación gráfica de AMOVA para la agrupación: vascos *versus* controles.

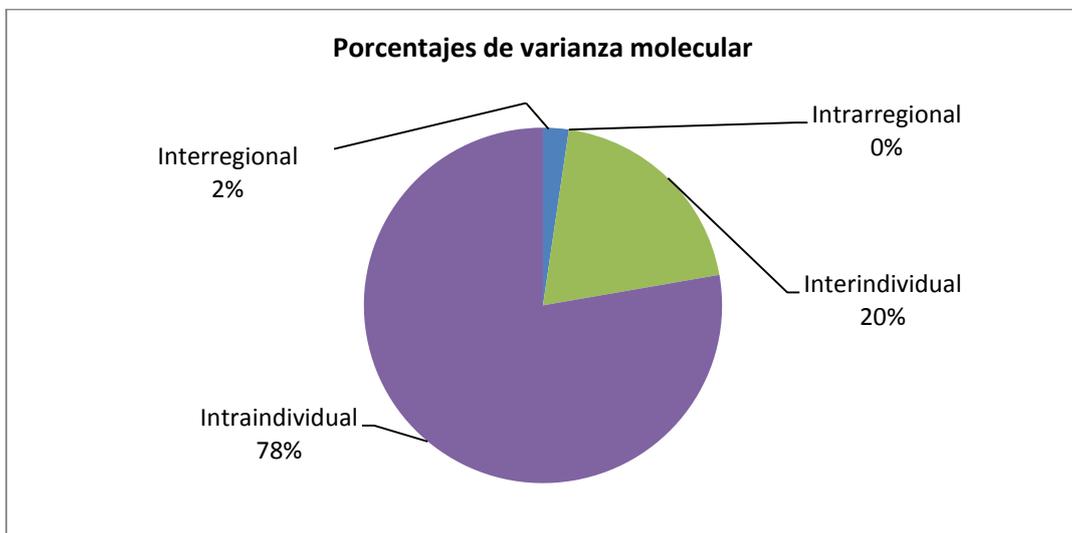


Figura 10: representación gráfica de AMOVA para la agrupación: Montevideo *versus* Interior.

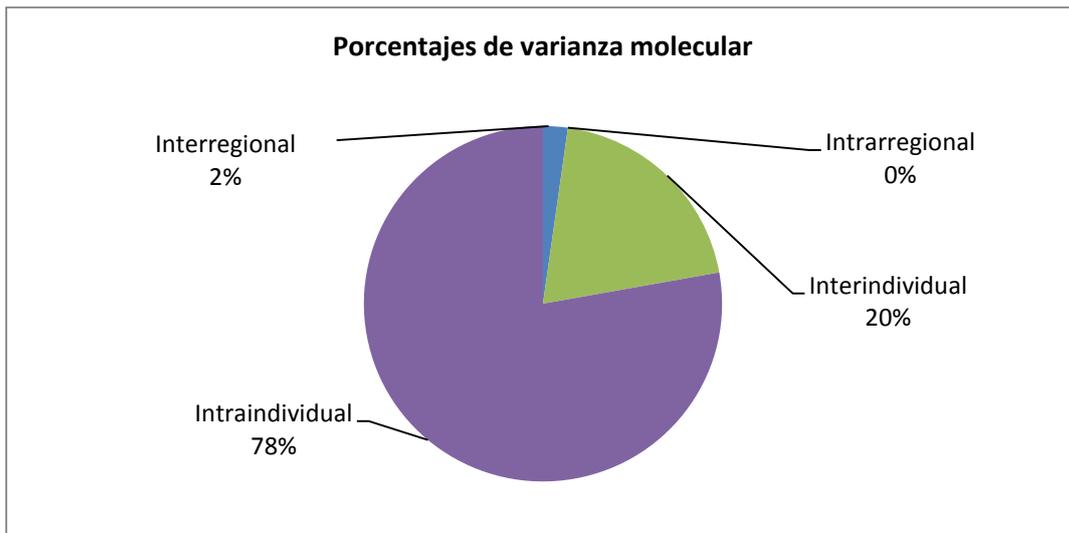


Figura 11: representación gráfica de AMOVA para la agrupación: vascos de Trinidad *versus* las muestras restantes.

Análisis de Componentes Principales (PCA)

En la figura 12 se representa el resultado del PCA mediante un diagrama de dispersión. En este se observan agrupaciones de poblaciones con características y orígenes genéticos comunes. España, Portugal, Italia y Francia se agrupan con valores negativos para el primer componente y valores positivos para el segundo componente. Las poblaciones indígenas americanas presentan valores positivos para el primer componente. Las muestras analizadas en este trabajo presentan valores negativos para el segundo componente, como también valores negativos para el primer componente, lo cual las asemeja principalmente a las muestras europeas. Por último la muestra africana se caracteriza por presentar valores positivos extremos para el segundo componente.

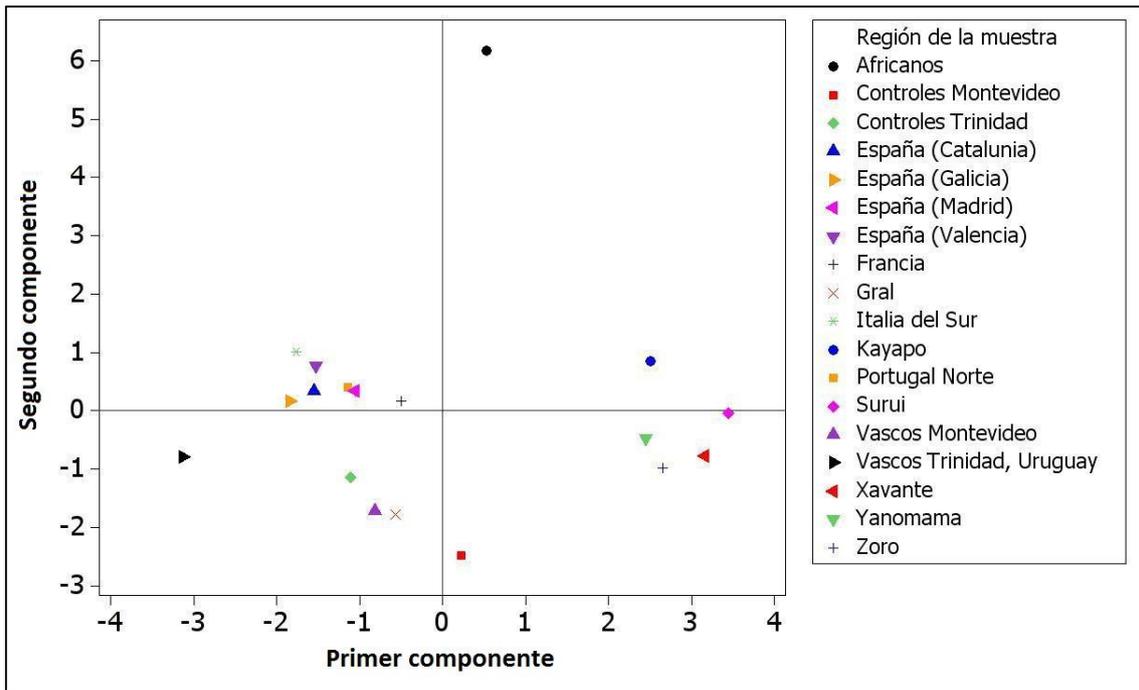


Figura 12: Diagrama de dispersión obtenido al aplicar un PCA con las frecuencias alélicas de D1S80 para varias poblaciones. Las poblaciones utilizadas para el análisis se detallan a la derecha del diagrama. La cruz para “Gral” se refiere al promedio de las frecuencias alélicas de las 4 muestras uruguayas.

Índice de probabilidad de identidad

En la tabla 6 se muestran los índices de probabilidad de identidad para cada población por separado y para todas en conjunto. Un índice de menos del 10% implica un potencial relativamente alto para el uso de este *locus* para la identificación individual. En este caso, todos los valores son menores al 10%.

Población 1	8,5E-02
Población 2	1,3E-01
Población 3	3,6E-02
Población 4	9,4E-02
Todas las poblaciones	5,6E-02

Tabla 6: índice de probabilidad de identidad para cada población por separado y en su conjunto.

Discusión

No se puede confirmar que la población 1 (vascos de Montevideo) se encuentre en equilibrio de H-W. Esto se podría explicar observando las frecuencias genotípicas de dicha muestra, donde se constata un exceso de homocigotas. Este resultado puede deberse a una heterogeneidad oculta en la muestra, o al pequeño tamaño de la misma (20 individuos) que puede producir fluctuaciones que afecten las proporciones de genotipos por efecto del muestreo. Este efecto se observa también en el número de alelos representados en la población, que se encuentra en proporción directa con el tamaño muestral. Así mismo, también puede dar cuenta de los altos índices de endogamia constatados para esta población, para los controles de Montevideo y los del interior (tabla 4). Estos índices, influyen en el cálculo de F_{IS} para las poblaciones en su conjunto, y por lo tanto en el F_{IT} . Sin embargo, no debemos descartar que efectivamente estemos observando un fenómeno genético poblacional consistente en la persistencia de un efecto fundador, considerando que desde el final del último ingreso masivo de vascos han pasado aproximadamente 5 generaciones. Por “efecto fundador” se entiende una forma particular de deriva génica en la cual la población migrante no presenta una estructura genética representativa de la población original. Esto, sumado al mantenimiento a lo largo del tiempo de patrones endógamos, podría explicar el exceso de homocigotas en la muestra de vascos de Montevideo.

Por otra parte, el índice de fijación F_{ST} , que nos indicaría la existencia de algún grado de subdivisión poblacional, presenta un valor de 0,02. Esto, a efectos genéticos y a nivel de frecuencias alélicas de las muestras estudiadas, indica que las mismas se comportan como pertenecientes a una misma población. Este resultado no necesariamente se contradice con las evidencias de endogamia discutidas en el párrafo anterior, ya que el índice de F_{ST} se calcula directamente a partir de frecuencias genotípicas esperadas.

El AMOVA corrobora los análisis anteriores, ya que, aunque se agrupen de distinta forma las 4 poblaciones usadas en este trabajo, la variación entre las mismas no supera el 2%. Se puede continuar afirmando, entonces, que aunque se analicen las 4 muestras con diferentes test, estas se siguen comportando como pertenecientes a una misma población.

En cuanto al análisis de los resultados a una mayor escala, producto de la aplicación del análisis de componentes principales, en el diagrama de dispersión se observa que todas las muestras uruguayas presentan valores negativos para ambos componentes. La agrupación más cercana a las mismas sería la de poblaciones europeas, compuesta por Francia, Italia, Portugal y España. En la publicación de Sans et al. (2011), el análisis del ADN mitocondrial de estos

individuos descendientes de vascos arrojó los siguientes porcentajes: 77,8% para haplogrupos europeos, el 20,4% para haplogrupos de indígenas americanos y el 1,8% para un haplogrupo africano. Con estos resultados a la vista se esperaría que los marcadores nucleares presenten cierto grado de correspondencia con el ADN mitocondrial, por lo que los vascos uruguayos deberían presentar mayor afinidad con esta agrupación europea en el diagrama de dispersión. En efecto, en los valores del primer componente no se observa gran diferencia; la mayor diferencia se encuentra en los valores del segundo componente. Es importante destacar que existe aproximadamente el mismo patrón, en el diagrama de dispersión, entre los vascos de Trinidad con la agrupación europea y entre los vascos de Trinidad con los vascos de Montevideo. Estos últimos se encuentran cercanos a las muestras control (sin antepasados vascos conocidos) tanto del interior como de Montevideo, lo que puede significar que los vascos de Trinidad retienen una mayor semejanza con su población de origen que los individuos descendientes de vascos residentes en Montevideo. La ubicación geográfica de ambas poblaciones probablemente tenga mucho que ver en esto, ya que Montevideo es una ciudad cosmopolita donde la mezcla génica es mucho más probable. Se esperaría sin embargo, que todas las muestras uruguayas se agrupen entre las europeas, las de los nativos americanos y la africana, aunque más alejadas de esta última. Lo que se aprecia en el diagrama es que las muestras uruguayas se agrupan entre las europeas y las de los nativos americanos, pero no presentan ninguna relación con la africana, especialmente en los valores del segundo componente.

Analizando las frecuencias alélicas, comparando las de las muestras uruguayas (tabla 3) con las del resto de las poblaciones utilizadas para el análisis (anexo III), se puede explicar de forma general el diagrama de dispersión, resultado del PCA. El alelo 18 junto con el 24, son los alelos más representados en todas las poblaciones. Sin embargo, la frecuencia alélica que presenta el alelo 19, para el caso de los africanos, es mayor que la del alelo 18. Lo mismo ocurre para los alelos 24 y 25, tanto para los africanos como para los nativos americanos Yanomama y Surui, ya que el 25 se encuentra mayor representado que el 24 en estos 3 casos. Por otra parte, la población africana tiene una mayor tendencia a los alelos con mayor número de repetidos, siendo esta la población con frecuencias más elevadas para los alelos mayores a 31 repetidos. Estas características pueden explicar, en parte, la gran divergencia del resto de las poblaciones frente a la africana.

Para el caso de los indígenas, las frecuencias alélicas que presentan para el alelo 18, se asemejan mucho a las que presentan los vascos de Montevideo, los controles de Montevideo, y en menor medida a la que presentan los controles de Trinidad. Para este mismo alelo, la frecuencia en los vascos de Trinidad se encuentra asociada a la que presentan las poblaciones europeas. Los alelos del 19 al 23, sin embargo, se encuentran más representados en la muestra

de vascos de Trinidad que en las poblaciones europeas; en cambio, para el alelo 24 y para los alelos con mayor cantidad de repetidos se observa una mayor representación en poblaciones europeas que en Trinidad. Estas similitudes y divergencias pueden explicar que no se encuentren en la misma agrupación en el diagrama de dispersión, pero sí que presenten un patrón de proximidad.

Conclusiones

En este trabajo se eligieron individuos descendientes de vascos como población en estudio, enmarcado en su importancia como parte de las primeras poblaciones fundadoras de este país. El estudio está contextualizado en una investigación multidisciplinaria comenzada en 2004 por el Departamento de Antropología Biológica de la Universidad de la República, en conjunto con la Asociación de descendientes de vascos Haize Hegoa. Particularmente este trabajo es parte de la continuación de los estudios genéticos publicados en primera instancia por Sans et al. (2011). Además el estudio de la composición genética de los individuos de este país (Sans 2009) ha sido sumamente revelador y polémico. Continuar desenmascarando nuestras raíces es de suma importancia para la construcción de la identidad nacional.

En cuanto a la utilidad del VNTR D1S80 para la identificación de mecanismos microevolutivos en las poblaciones de descendientes de vascos en Uruguay, podemos establecer conclusiones a varias escalas. A la escala continental el marcador mostró ser capaz de distinguir entre los principales aportes a nivel de poblaciones de origen, predominando el aporte europeo, el indígena y el africano, en orden decreciente de representación en las muestras uruguayas analizadas. A una menor escala, el estudio con el marcador D1S80, de los descendientes de vascos de Trinidad, corrobora a grandes rasgos, los resultados obtenidos empleando ADN mitocondrial, mostrando a las comunidades de vascos del Uruguay como integradas genéticamente a la población uruguaya, pero con una mayor representación en su acervo genético de su población de origen (europea) comparado con el resto de la población uruguaya. Esta diferencia, sin embargo, no es lo suficientemente grande como para considerar a la comunidad de Trinidad como netamente separada del resto de la población uruguaya, como muestran los resultados del AMOVA y los estadísticos F.

Por último, según los resultados obtenidos aplicando el índice de probabilidad de identidad, este marcador es lo suficientemente variable como para resultar útil en la identificación individual.

Bibliografía

Al-Soud, W., Rådström, P., 2000. Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat. *J. Clin. Microbiol.* 38:4463-4470.

Arakura, A., Liu, C., Ota, M., Fukushima, H., 1998. Subtyping and characterization of D1S80 alleles in a Japanese population using PCR-RFLP. *Int. J. Legal Med.* 111: 183-187.

Balamurugan, K., Tracey, ML., Heine, U., Maha, GC., Duncan GT 2012. Mutation at the Human D1S80 Minisatellite Locus. *The Scientific World Journal* 2012: 917235.

Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A., Eisenberg, A., Allen, R., 1991. Analysis of the VNTR Locus DIS80 by the PCR Followed by High-Resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 48:137-144.

Cabrero, J., Camacho, J., 2002. Fundamento de Genética de Poblaciones. En *Evolución: la base de la biología*. Cap. 6, 83-126.

Cavalli-Sforza, L., Bodmer, F., 1971. *The genetics of human populations*. W. H. Freeman, San Francisco.

Da Silva, WA., Bortolini, MC., Meyer, D., Salzano, FM., Elion, J., Krishnamoorthy, R., Schneider, MP., De Guerra, DC., Layrisse, Z., Castellano, HM., Weimer, TD., Zago, MA., 1999. Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable loci. *Am. J. Phys. Anthropol.* 109:425-437.

Denoeud, F., Vergnaud, G., Benson, G., 2003. Predicting Human Minisatellite Polymorphism. *Genome Res.* 13: 856-867.

Dunteman, GH., 1989. *Principal components analysis*. Sage: New York.

Evetts, IW., Weir, BS., 1998. *Interpreting DNA evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer, Sunderland, MA.

Excoffier, L., Smouse, PE., Quattro, JM., 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131:479-491.

Fusté, C., 2012. *Studies in Population Genetics*. Book and Journals, www.intechopen.com (Accedido el 4 de Noviembre del 2013).

Geisser, S., 1999. In dispraise of inconsistent DNA relative frequency estimates. En ME Halloran y S. Geisser (eds). *Statistics in genetics*. 25-30. Springer-Verlag: New York.

Heidrich, EM., Hutz, MH., Salzano, FM., Coimbra, CE., Santos, RV., 1995. D1S80 locus variability in three Brazilian ethnic groups. *Hum Biol.* 67: 311-319.

Helminen, P., Sajantila, A., Johnsson, V., Lukka, M., Ehnholm, C., Peltonen, L., 1992. Amplification of three hypervariable regions by polymerase chain reaction in paternity determinations:

comparison with conventional methods and DNA fingerprinting. *Molecular and Cellular Probes* 6:21-26.

Hidalgo, PC., Bengochea, M., Abilleira, D., Cabrera, A., Alvarez, I., 2005. Genetic admixture estimate in the Uruguayan population based on the loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *Int. J. Hum. Genet.* 5:217–222.

Hidalgo, PC., Ackermann, E., Figueiro, G., Sans, M., 2009. Extracción y purificación de ADN de pelo a pH muy ácido. Presentado en las Novenas Jornadas Nacionales de Antropología Biológica (Puerto Madryn, Argentina).

Hutz, MH., Mattevi, VS., Callegari-Jacques, SM., Salzano, FM., Coimbra, CEA., Santos, RV., Carnese, RF., Goicoechea, AS., Dejean, CB., 1997. D1S80 locus variability in South American Indians. *Ann. Hum. Biol.* 24:249-255.

Jeffreys, A., Royle, N., Wilson, V., Wong, Z., 1988. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 332:278-281.

Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S., 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.

Kasai, K., Nakamura, Y., White, R., 1990. Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *J. Forensic Sci.* 35:1196-1200.

Kass, D., Batzer, M. 2004. Genome Organization/Human. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, www.els.net (Accedido el 11 de Diciembre del 2013).

Marenales, M., Luzuriaga, J. C., 1990. Vascos en el Uruguay. Colección: Nuestras Raíces 4. Editorial Nuestra Tierra, Montevideo.

Mastana, S., Papiha, S., 2000. D1S80 distribution in world populations with new data from the UK and the Indian sub-continent. *Ann. Hum. Biol.* 28:308-318.

Mengoni, A., Bazzicalupo, M., 2002. The statistical treatment of data and the analysis of molecular variance (AMOVA) in molecular microbial ecology. *Ann. Microbiol.* 52:95-101.

Miller, RG., 1997. *Beyond ANOVA. Basics of Applied Statistics.* Chapman & Hall: London.

Miller, SA., Dykes, DD., Polesky, HF., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.

Nagylaki, T., 1998. Fixation Indices in Subdivided Populations. *Genetics* 148:1325-1332.

Naidoo, N., Pawitan, Y., Soong, R., Cooper, D., Ku, C. 2011. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Hum. Genomics* 5:577–622.

Näslund, K., Saetre, P., Salomé, J., Bergström, T., Jareborg, N., Jazin, E., 2005. Genome-wide prediction of human VNTRs. *Genomics* 85:24–35.

- Nei, M., 1977 F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41:225–233.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Peakall, R., Smouse, PE., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Peterson, BL., Su, B., Chakraborty, R., Budowle, B., Gaensslen, RE., 2000. World population data for the HLADQA1, PM (R) and D1S80 loci least and most common profile frequencies for combinations of loci estimated following NRCII guidelines. *J. Forensic Sci.* 45:118–146.
- Pinheiro, MF., Pontes, ML., Huguet, E., Gené, M., Pinto da Costa, J., Moreno, P. 1996: Study of three AMPFLPs (D1S80, 3'ApoB and YNZ22) in the population of the North of Portugal. *For. Sci. Int.* 79:23-29.
- Richard, G., Pâques, F., 2000. Mini-and microsatellite expansion: the recombination connection. *Embo reports* 1:122-126.
- Sajantila, A., Budowle, B., Strom, M., Johnsson, V., Lukka, M., Peltonen, L., Ehnholm, C., 1992. PCR Amplification of Alleles at the DIS80 Locus: Comparison of a Finnish and a North American Caucasian Population Sample, and Forensic Casework Evaluation. *Am. J. Hum. Genet.* 50:816-825.
- Sanguinetti, N., Simpson, A., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:915-918.
- Sans, M., 2009. "Raza", adscripción étnica y genética en Uruguay. *RUNA XXX*, 2:163-174.
- Sans, M., Figueiro, G., Ackermann, E., Barreto, I., Egaña, A., Bertoni, B., Poittevin-Gilmet, E., Maytia, D., Hidalgo, PC., 2011. Mitochondrial DNA in Basque Descendants from the City of Trinidad, Uruguay: Uruguayan- or Basque-like Population?. *Hum Biol* 83:55-70.
- Sciacca, G., Grillo, A., Paravizzini, G., Barchitta, M., Libra, M., Emmanuele, G., Callari, D., Agodi, A., Travali, S., 2004. D1S80 VNTR locus genotypes in a population of Southeastern Sicily: Distribution and genetic disequilibrium. *Am. J. Hum. Biol.* 16:91-94.
- Sharp, PA., Sugden, B., Sambrook, J., 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055–3063.
- Shennan, S., 1992. *Arqueología Cuantitativa*. Editorial Crítica, Barcelona.
- Smrcka, A., Sternweis, P., 1993. Regulation of Purified Subtypes of Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C beta by G Protein alpha and beta gamma subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 9667-9674.
- Sutherland, G., Baker, E., Richards, R., 1998. Fragile sites still breaking. *Trends Genet.* 14:501-506.

Tarantul, VZ., 2003. Genom cheloveka: Entsiklopediya, napisannaya chetyr'mya bukvami (Human Genome: Encyclopedia Written with Four Letters), Moscú.

Vafiadis, P., Bennett, S., Todd, J., Nadeau, J., Grabs, R., Goodyer, C., Wickramasinghe, S., Colle, E., Polychronakos, C., 1997. Insulin expression in human thymus is modulated by INSVNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nature Genetics* 15:289-292.

Verbenko, D., Limborska, S., 2008. Hypervariable Human Minisatellite DNA Markers: D1S80 Locus in Population Studies. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 23: 53–62.

Vergnaud, G., Denoeud, F., 2000. Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome Res.* 10: 899-907.

Viguera, E., Canceill, D., Ehrlich, S., 2001. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J.* 20:2587–2595.

Wright, S., 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28:14-38.

Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:23-54.

Anexo I

Composición gel de poliacrilamida separador al 6%

Para un volumen de 7,5 ml por gel,

- 4,5 ml H2O mQ
- 1,5 ml poliacrilamida 30%
- 1,5 ml TBE 5X
- 95 ul APS 10%
- 9,5 ul Temed

Composición de gel de poliacrilamida concentrador al 3%

Para un volumen de 2,5 ml por gel:

- 1,75 ml H2O mQ
- 0,250 ml poliacrilamida 30%
- 0,5 ml TBE 5X
- 52,5 ul APS 10%
- 5,25 ul Temed

Anexo II

TINCIÓN CON PLATA DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Soluciones necesarias:

FIJADOR: 100 ml de Etanol 95º, 5 ml de ácido acético, y completar a 1 litro con agua.

PLATA: 2 g por litro.

REVELADOR: 30 gr de NaOH por litro (antes de ser utilizado se agrega el formaldehído).

Procedimiento:

1. Sumergir el gel en fijador por 3-5 minutos (mínimo) con agitación.
2. Remover el fijador.
3. Sumergir el gel en plata por 5 minutos (mínimo) con agitación.
4. Sumergir el gel en revelador (habiéndole agregado previamente 500 ul de formaldehído comercial cada 150 ml). Agitar fuerte al principio para evitar que el exceso de la plata precipite sobre el gel, y luego revelar con agitación hasta que se observen las bandas.
6. Repetir el paso 1.
7. Sobre vidrio mojado, estirar celofán poroso mojado. Colocar el gel y una segunda capa de celofán mojado bien estirado. Dejar secar toda la noche como mínimo.

Notas

Puede repetirse la tinción si resultó insuficiente. Las bandas pueden eluirse en agua y reamplificarse. El método es una variante de la publicada por Sanguinetti et al. 1994.

Anexo III

Tabla con las frecuencias alélicas que presenta el marcador D1S80 para todas las poblaciones utilizadas como referencia.

Región de la muestra	16	17	18	19	20	21	22/23	24	25	26	27	28	29	30	31	>31
Italia del Sur	0,000	0,005	0,155	0,000	0,015	0,029	0,072	0,436	0,029	0,029	0,005	0,107	0,049	0,010	0,044	0,015
España (Valencia)	0,004	0,004	0,217	0,004	0,022	0,017	0,060	0,391	0,030	0,030	0,026	0,026	0,070	0,017	0,061	0,021
España (Catalunia)	0,003	0,003	0,227	0,014	0,027	0,033	0,071	0,334	0,057	0,019	0,016	0,055	0,038	0,008	0,068	0,027
España (Galicia)	0,003	0,007	0,262	0,003	0,034	0,030	0,068	0,356	0,030	0,003	0,020	0,027	0,074	0,010	0,040	0,033
España (Madrid)	0,000	0,005	0,224	0,000	0,025	0,047	0,047	0,372	0,052	0,017	0,012	0,017	0,074	0,005	0,057	0,046
Portugal Norte	0,002	0,007	0,308	0,009	0,018	0,026	0,042	0,308	0,031	0,009	0,009	0,037	0,088	0,007	0,057	0,042
Francia	0,000	0,004	0,266	0,015	0,019	0,022	0,074	0,310	0,063	0,026	0,015	0,052	0,029	0,019	0,067	0,019
Africanos	0,000	0,005	0,015	0,025	0,000	0,005	0,273	0,029	0,129	0,059	0,000	0,029	0,119	0,019	0,015	0,278
Yanomama	0,000	0,000	0,460	0,000	0,000	0,000	0,000	0,160	0,180	0,000	0,000	0,000	0,060	0,020	0,060	0,060
Kayapo	0,000	0,000	0,32	0,000	0,000	0,000	0,020	0,16	0,120	0,040	0,000	0,016	0,000	0,100	0,080	0,144
Xavante	0,000	0,000	0,44	0,000	0,000	0,000	0,000	0,14	0,160	0,040	0,000	0,000	0,000	0,100	0,120	0,000
Zoro	0,000	0,000	0,32	0,000	0,000	0,000	0,000	0,06	0,040	0,000	0,000	0,020	0,000	0,560	0,000	0,000
Surui	0,000	0,000	0,354	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,104	0,063	0,000	0,000	0,000	0,396	0,000	0,000

Anexo IV

Tabla con los genotipos de todas las muestras utilizadas en este estudio.

Código	Vasco/Control	Localidad	Alelo 1	Alelo 2
VAS0087	Vasco	Montevideo	28	28
VAS1002	Vasco	Montevideo	18	18
VAS1930	Vasco	Montevideo	24	28
VAS1981	Vasco	Montevideo	18	18
VAS2568	Vasco	Montevideo	18	24
VAS2655	Vasco	Montevideo	25	25
VAS2792	Vasco	Montevideo	20	24
VAS3041	Vasco	Montevideo	19	31
VAS3086	Vasco	Montevideo	18	18
VAS3119	Vasco	Montevideo	21	21
VAS4134	Vasco	Montevideo	21	24
VAS7475	Vasco	Montevideo	18	18
VAS7661	Vasco	Montevideo	18	18
VAS7796	Vasco	Montevideo	24	30
VAS8151	Vasco	Montevideo	18	18
VAS8161	Vasco	Montevideo	24	24
VAS9389	Vasco	Montevideo	18	25
VAS9642	Vasco	Montevideo	18	24
VAS9519	Vasco	Montevideo	25	25
VAS 2944	Vasco	Montevideo	24	24
CON0765	Control	Montevideo	18	18
CON1014	Control	Montevideo	18	29
CON1467	Control	Montevideo	18	25
CON1581	Control	Montevideo	18	25
CON2500	Control	Montevideo	18	31
CON2585	Control	Montevideo	18	24

CON3927	Control	Montevideo	18	18
CON4745	Control	Montevideo	24	24
CON7317	Control	Montevideo	20	24
CON8110	Control	Montevideo	18	24
CON8941	Control	Montevideo	18	24
CON9427	Control	Montevideo	18	18
CON9438	Control	Montevideo	18	27
CON9687	Control	Montevideo	18	18
SB4745	Control	Montevideo	24	24
KC008	Control	Montevideo	18	18
KC010	Control	Montevideo	22, 23	25
KC011	Control	Montevideo	18	24
MTRT-1	Control	Montevideo	31	31
GD	Control	Montevideo	25	25
PH	Control	Montevideo	18	20
KC 018	Control	Montevideo	24	24
CON8834	Control	Montevideo	18	24
KC002	Control	Interior	18	25
KC025	Control	Interior	21	24
KC029	Control	Interior	25	27
KC080	Control	Interior	27	27
KC107	Control	Interior	18	18
KC168	Control	Interior	24	25
KP093	Control	Interior	22, 23	24
KP069	Control	Interior	18	18
KC079	Control	Interior	24	24
KC151	Control	Interior	22, 23	22, 23
KC164	Control	Interior	24	24
KC172	Control	Interior	22, 23	22, 23
KC181	Control	Interior	18	24
KC215	Control	Interior	18	18
KP036	Control	Interior	18	24
KP109	Control	Interior	18	18

Vascos01	Vasco	Trinidad	17	17
Vascos02	Vasco	Trinidad	17	29
Vascos03	Vasco	Trinidad	18	26
Vascos04	Vasco	Trinidad	18	21
Vascos05	Vasco	Trinidad	21	24
Vascos06	Vasco	Trinidad	19	25
Vascos07	Vasco	Trinidad	21	25
Vascos08	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos09	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos10	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos11	Vasco	Trinidad	18	18
Vascos12	Vasco	Trinidad	18	31
Vascos13	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos14	Vasco	Trinidad	18	27
Vascos15	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos16	Vasco	Trinidad	21	24
Vascos17	Vasco	Trinidad	18	18
Vascos18	Vasco	Trinidad	20	22, 23
Vascos19	Vasco	Trinidad	27	28
Vascos20	Vasco	Trinidad	18	22, 23
Vascos21	Vasco	Trinidad	18	28
Vascos22	Vasco	Trinidad	18	22, 23
Vascos23	Vasco	Trinidad	18	19
Vascos24	Vasco	Trinidad	24	25
Vascos25	Vasco	Trinidad	21	24
Vascos26	Vasco	Trinidad	20	21
Vascos28	Vasco	Trinidad	24	27
Vascos29	Vasco	Trinidad	17	20
Vascos30	Vasco	Trinidad	24	24
Vascos31	Vasco	Trinidad	21	24
Vascos32	Vasco	Trinidad	22, 23	22, 23
Vascos34	Vasco	Trinidad	24	24
Vascos35	Vasco	Trinidad	18	24

Vascos36	Vasco	Trinidad	20	29
Vascos37	Vasco	Trinidad	17	24
Vascos38	Vasco	Trinidad	18	21
Vascos39	Vasco	Trinidad	20	27
Vascos40	Vasco	Trinidad	18	28
Vascos41	Vasco	Trinidad	22, 23	22, 23
Vascos42	Vasco	Trinidad	21	27
Vascos43	Vasco	Trinidad	22, 23	25
Vascos44	Vasco	Trinidad	17	22, 23
Vascos45	Vasco	Trinidad	17	26
Vascos46	Vasco	Trinidad	22, 23	22, 23
Vascos47	Vasco	Trinidad	19	22, 23
Vascos48	Vasco	Trinidad	18	19
Vascos49	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos50	Vasco	Trinidad	18	18
Vascos51	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos52	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos53	Vasco	Trinidad	18	24
Vascos54	Vasco	Trinidad	18	20
Vascos55	Vasco	Trinidad	20	22, 23
Vascos58	Vasco	Trinidad	21	24