



Universidad de la República Uruguay
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Área Biología – Subárea Genética

Estudio de la variante T1540C del gen EDAR y su relación
con diente en pala y ancestría indígena en el Uruguay

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Estefanía Acosta
Orientadora: Dra. Mónica Sans
Co-orientador: Dr. Gonzalo Figueiro

Tribunal

Dr. Bernardo Bertoni
Dra. Josefina Motti
Dra. Valentina Colistro

Diciembre 2021

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a todos quienes dieron su consentimiento, aceptando participar en este trabajo e integrando las muestras de Montevideo.

También al Polo de Diversidad Genética Humana del Centro Universitario de Tacuarembó, Udelar por compartir las muestras y datos usados en la muestra de Tacuarembó.

Por los datos de la ancestría biparental agradezco a la Universidad de Compostela y a los doctores Ángel Carracedo y María Torres.

A la Dra. Alicia Picapedra que con mucho entusiasmo y gran trabajo me ayudó a recolectar una importante cantidad de muestras.

Especialmente a mi tutora Dra. Mónica Sans y cotutor Dr. Gonzalo Figueiro por la paciencia y dedicación a que esto saliera adelante.

A mis compañeros de laboratorio, particularmente a Patricia Mut por siempre estar ahí.

A mi familia, principalmente mi madre.

A amigas: Leti, Vanni y Colo por bancarme la cabeza en esta y mil locuras.

Y a mis compañeros de trabajo.

Índice

Agradecimientos.....	2
Índice.....	3
Resumen	5
1. Introducción	7
1.1 Antecedentes.....	7
1.2 Morfología del diente en pala	7
1.3 El gen EDAR: historia e implicancias.....	11
1.4 Selección sobre el gen EDAR	13
1.5 Características del ADN mitocondrial y determinación de haplogrupos.....	14
1.6 Ancestría indígena en Uruguay: estudios de ADN mitocondrial y marcadores	16
biparentales	16
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo general	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. Hipótesis.....	19
4. Materiales y métodos	20
4.1 Muestras: recolección y grupos.....	20
4.2 Evaluación del rasgo morfológico	20
4.3 Extracción de ADN	21
4.4 Determinación de genotipos EDAR.....	21
4.5 PCR en tiempo final y secuenciación: determinación de los haplogrupos	22
mitocondriales	22
4.6 Análisis de AIMs.....	23
4.7 Análisis estadísticos.....	23
4.7.1 Fenotipo	24
4.7.2 Haplogrupo mitocondrial	24
4.7.3 Distancia genética con otras poblaciones	25
4.7.4 Test de AMOVA.....	26
4.7.5 Frecuencias alélicas y equilibrio de Hardy Weinberg.....	27
4.7.6 Alelo vs ancestría biparental	27

5. Resultados.....	28
5.1 Muestra de Montevideo. Individuos de la muestra caso-control	28
5.1.1 Análisis del genotipo vs el fenotipo	31
5.1.2 Análisis del alelo vs el fenotipo.....	31
5.1.2.1 Test de Fisher	31
5.1.2.2 Odds Ratio.....	32
5.1.3 Análisis del fenotipo vs el haplogrupo mitocondrial	32
5.1.4 Análisis del genotipo vs el haplogrupo mitocondrial	32
5.1.5 Análisis del alelo vs el haplogrupo mitocondrial	33
5.1.6 Análisis de las frecuencias alélicas y el equilibrio Hardy-Weinberg	34
5.1.7 Análisis de las distancias genéticas con otras poblaciones	34
5.1.8 AMOVA	37
5.2 Muestra de Tacuarembó	38
5.2.1 Análisis de genotipo vs haplogrupo mitocondrial	39
5.2.2 Análisis de alelo vs haplogrupo mitocondrial.....	40
5.2.3 Análisis de alelo vs ancestría biparental	40
6. Discusión	43
6.1 Relación entre fenotipo diente en pala y el alelo T1540C para la muestra de	
Montevideo.	43
6.2 Relación entre el gen EDAR y la variante T1540C como indicador de ancestría	
indígena.	44
6.3 Relación entre las frecuencias de T1540C para distintas poblaciones	46
7. Conclusiones	48
8. Bibliografía	49
9. Anexo.....	56

Resumen

El Departamento de Antropología Biológica (FHCE – Udelar) investiga sobre mestizaje y ancestría en la población uruguaya desde 1986. En esta investigación en particular, se retomó el análisis del carácter “incisivo en pala”, que fuera utilizado en estudios tempranos como rasgo morfológico distintivo de ascendencia indígena.

Diversos autores han concluido que el factor fundamental en la generación de este rasgo es una mutación no sinónima en el gen del receptor de la ectodisplasia A (EDAR, variante T1540C) que se encuentra en altas frecuencias en poblaciones americanas y asiáticas. A partir de esto, se planteó como objetivo principal analizar la frecuencia de la variante del gen en Uruguay en portadores y no portadores del rasgo morfológico diente en pala, y relacionar los datos con los previamente obtenidos por el Departamento, así como también, verificar la asociación con uno de los marcadores moleculares uniparentales de ancestría.

La determinación de los genotipos para EDAR T1540C se realizó a través de la técnica de PCR en tiempo real y se utilizaron sondas aleloespecíficas. La muestra contó con 100 individuos, 49 individuos con la característica de incisivo en pala y 51 individuos sin el rasgo. Para la totalidad de ellos se determinaron los haplogrupos mitocondriales, que se relacionaron con las frecuencias de los alelos y genotipos de EDAR mediante diversas pruebas estadísticas. También se utilizó una muestra de Tacuarembó, para la cual se contaba con datos de ancestría biparental y haplogrupos mitocondriales. En este caso se analizó la relación de la variante alélica EDAR T1540C con la ancestría biparental y los genotipos de esta variante con los haplogrupos mitocondriales. Por último, las frecuencias alélicas obtenidas para EDAR T1540C se compararon con las de otras poblaciones a nivel mundial a través de distancias genéticas.

Los resultados obtenidos indican que las personas que aportan el alelo C presentan con mayor frecuencia el fenotipo diente en pala que aquellos que no lo portan. La prueba de Odds Ratio realizada determinó que portar el alelo C aumenta en 3,36 la probabilidad de tener diente en pala. Respecto al vínculo entre el alelo T1540C y la ancestría indígena individual, no se halló relación entre el alelo T1540C y la ancestría por línea materna. Por último, la frecuencia del alelo EDAR T1540C en la población uruguaya es consistente con lo esperado para una población mestiza americana. En cuanto a la distancia genética con otras poblaciones, tanto la muestra de Montevideo como la muestra de Tacuarembó, se encuentran más cercana a las poblaciones de Colombia y Puerto Rico, caracterizadas por un grado de mestizaje similar al de la población uruguaya.

En suma, todos los datos obtenidos son concordantes con los estudios previos en esta materia como así también con trabajos realizados en otras poblaciones. Dado que los marcadores se transmiten de forma independiente y que los eventos de mestizajes sucedidos en la población

caracterizada en este estudio ocurrieron en una ventana temporal lo suficientemente extensa, es posible que ya no exista relación entre el rasgo fenotípico y los datos genéticos. Es por esto que la variante T1540C y el rasgo diente en pala no pueden ser utilizados como elemento de aproximación cuantitativa a la ancestría de un individuo según los datos obtenidos de las muestras estudiada.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

La actual investigación propone retomar una línea que centra su interés en el "incisivo en pala", característica que fuera utilizada en estudios tempranos como rasgo morfológico distintivo de ascendencia indígena (Sans, 1992). El diente en pala es una concavidad triangular formada en la cara palatina o lingual de los dientes, generalmente incisivos superiores centrales y laterales, delimitada por crestas marginales prominentes acompañadas o no de un cingulo protuberante (Sassi et al. 2013).

El trabajo de Sans (1992) determinó que la frecuencia de este fenotipo en muestras pequeñas de los departamentos de Montevideo y Tacuarembó fue de 23% y 26% respectivamente. Además, quienes declararon tener ancestros indígenas presentaron mayor incidencia del rasgo. Más cercano en el tiempo, Sassi et al. (2013) realizaron un estudio con 544 muestras obtenidas en Montevideo, en las cuales se encontró que la frecuencia para esta característica llega al 35,5%.

Cabe destacar también que la ciudad de Tacuarembó es de especial interés por tratarse de una de las regiones de Uruguay con mayor proporción de ancestría indígena. Sans et al, (1997) reporta frecuencias de hasta 65% para ancestría europea, 15% para ancestría africana, y 20% para ancestría indígena utilizando marcadores en grupos sanguíneos, proteínas de suero sanguíneo y HLA (de sus siglas en inglés, *human leukocyte antigens*). Bonilla et al. (2004) trabajaron tanto con enzimas de restricción como con secuenciación en 5 regiones mitocondriales, determinando una ancestría de 20,8% para europeo, 16,7% para africano y 62,0% para indígena.

1.2 Morfología del diente en pala

Los seres humanos cuentan con ocho dientes incisivos, cuatro superiores y cuatro inferiores, que se ubican a ambos lados de la línea media de los maxilares superior e inferior. A su vez, estos se clasifican en centrales y laterales y son fundamentales en el proceso de corte de los alimentos durante la masticación.

Los dientes tienen dos secciones: la sección de la corona y la de la raíz, la corona se forma en primer lugar. La pulpa es el tejido blando que le confiere vascularización, inervación y nutrición al diente. La corona es un tejido duro, no regenerable, formado por esmalte (exterior) y dentina, tejido nexa entre el esmalte y la pulpa (Fig. 1) (Guzmán, 2018).

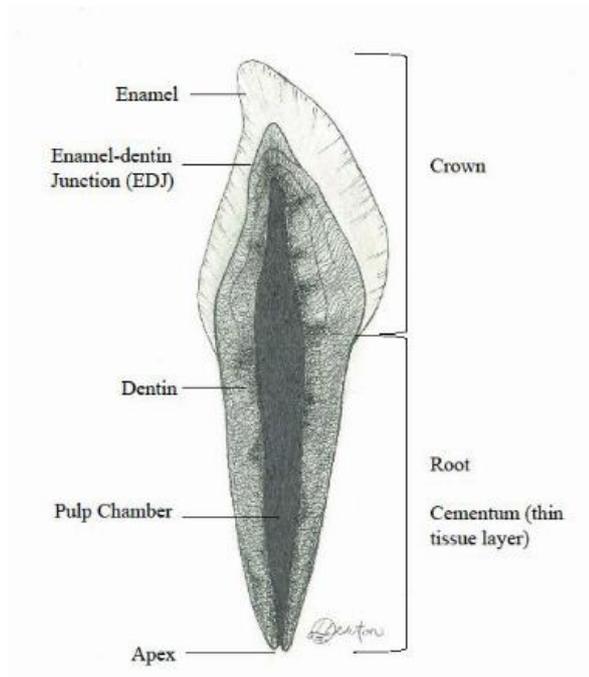


Figura 1. Anatomía de un incisivo superior. Tomado de (Denton, 2011)

El fenotipo diente en pala refiere a una formación estructural en los dientes incisivos centrales y laterales, generalmente superiores y en la cara lingual, que se particulariza por tener una fosa central delimitada por crestas formadas principalmente por el esmalte y la dentina (Fig. 2). Esta caracterización morfológica fue observada inicialmente por Hrdlička en 1920 quien además determinó que la característica podía aparecer con diferentes grados de expresión: ausente, leve, moderado y marcado (Hrdlička, 1920).



Figura 2. Molde en yeso que muestra morfología de diente en pala. (Sassi et al. 2013)

Actualmente el estudio y la estandarización de las variantes morfológicas dentales se resume en el *Arizona State University Dental Anthropology System* (ASUDAS) (Turner, et al. 1991). Este

sistema permite identificar, más allá de la presencia/ausencia del rasgo, diferentes grados de expresión para que los observadores puedan analizar y obtener resultados reproducibles. Las placas desarrolladas en este sistema consisten en moldes realizados en yeso y son una representación física de los dientes y sus rasgos. En el trabajo Turner et al. (1991) se realizó una placa para cada uno de los 38 rasgos morfológicos.

En el trabajo de Sassi et al. (2013) se relevaron 9 características en una muestra de Montevideo, utilizando este sistema. Los rasgos prevalentes fueron las ausencias del hipoconúlido e hipocono, los dientes en forma de pala (frecuencia del 35,5%) y el tubérculo de Carabelli (frecuencia del 27,2%). Estos rasgos son importantes tanto en el área de la odontología, como en la antropología e incluso han sido de mucha utilidad en el ámbito forense. Por ejemplo, uno de los más utilizados en antropología es el tubérculo de Carabelli, una formación que puede presentar diferentes formas y niveles (ranura, depresión, tubérculo, pequeña, mediana o gran cúspide) y se halla en los molares superiores. Este rasgo es de importancia por tener frecuencia alta en europeos, moderada en africanos y escasa en indígenas y asiáticos (Sassi et al. 2013) (Turner, 1967).



Figura 3. Graduación según el sistema ASUDAS. Arriba: incisivos centrales superiores. Abajo: incisivos laterales superiores. Tomado de (Denton, 2011)

Respecto a la característica de diente en pala (en inglés: *shovel shape*; Fig. 3), el sistema ASUDAS cuenta con 7 grados de expresión para los incisivos superiores, centrales y laterales, y caninos superiores.

De menor a mayor:

0 Nada: la superficie de la cara lingual es plana.

1 Débil: se observan elevaciones muy sutiles.

2 Trazo: elevaciones son fácilmente observables.

3 Semi pala: crestas marginales y convergencia en el cingulo sugerentes.

4 Semi pala: iguales características que 3 pero más marcadas.

5 Pala: fuerte desarrollo de crestas que casi hacen contacto en el cingulo.

6 Pala marcada: desarrollo aún mayor de las características en 5.

7 Barril (solo en laterales): expresión excede grado 6.

Las características utilizadas en este sistema fueron escogidas por ser fácilmente observables, la mayoría subsisten durante el tiempo de vida del individuo (incluso en condiciones duras de vida) y tienen bajo dimorfismo sexual. Además, se pueden utilizar para caracterizar poblaciones (Turner, et al. 1991).

El estudio de rasgos dentarios no-métricos, consiste en observar, registrar, analizar y comprender el comportamiento de la expresión (frecuencia y variabilidad) de la morfología coronal y radicular de los dientes humanos. Frecuentemente son empleados para estimar la relación biológica entre poblaciones, y también, para esclarecer los procesos históricos, culturales y biológicos evolutivos (Guigliani et al. 2014).

La morfología dental ha sido utilizada para identificar y relacionar poblaciones, tanto antiguas como modernas. Si bien la forma de la característica diente en pala para poblaciones actuales no es igual a las encontradas en especies antiguas, sí se han identificado algunas estructuras similares en los registros fósiles de diferentes especies (Denton, 2011).

En poblaciones indígenas americanas prehispánicas, la frecuencia del diente en pala en los incisivos superiores fue reportada en entre 95% y un 100% (Hanihara, 2008; Sutter, 2005). En la población moderna son muchos los trabajos que identifican esta característica, especialmente en Asia y en indígenas americanos (Kimura et al. 2009). Turner, (1979) reporta una frecuencia del 98,8% en individuos originarios del nororiente asiático, 99,8% en indígenas sudamericanos y 29,4% en oriundos del noreste europeo. Hanihara, (2008) reporta la frecuencia de este rasgo en los incisivos centrales superiores. Los valores promedios entre

hombres y mujeres para las siguientes poblaciones son: para el este y noroeste de Asia, 97,5%. 47,4% para individuos de África subsahariana y 33,7% para europeos.

Inicialmente, las diferentes características dentales fueron separadas en dos grupos: sundadontes y sinodontes. Turner, (1990) propone que los rasgos sundadontes evolucionaron en el sureste asiático en el Pleistoceno tardío hacia el patrón sinodonte (más complejo) en el norte y este de Asia. En este trabajo se encontró que son ocho los rasgos (entre ellos, doble pala, una raíz en primeros premolares, extensión en el esmalte en primer molar), tanto en la raíz como en la corona, con diferencias significativas entre ambos, entre los que se encuentra el rasgo diente en pala, que presenta una frecuencia mayor en los sinodontes.

Los restos dentales hallados exhibían características bien diferenciadas dependiendo de su zona de origen. El patrón sundadonte corresponde a las poblaciones del sureste asiático, Indonesia y Polinesia mientras que el patrón sinodonte corresponde a las poblaciones de China, Japón, Siberia y América. (Turner, 1989)

1.3 El gen EDAR: historia e implicancias

En la odontogénesis (formación de las piezas dentales), interactúan alrededor de 300 genes que se expresan en sitios específicos del tejido ectodérmico y del tejido ectomesenquimal, jugando un rol clave en etapas como la diferenciación de los dientes (Guzmán, 2018). A lo largo de los años, algunas de las características fenotípicas fueron asociadas a genes de referencia. Este es el caso del rasgo estudiado en esta investigación. Kimura et al. (2009) determinó una fuerte asociación entre el grado de expresión de los incisivos en pala y el genotipo formado por la variante T1540C en poblaciones asiáticas.

Estudios recientes (Kimura et al. 2009; Park et al. 2012) concluyeron que el factor genético fundamental en la generación del rasgo diente en pala es una mutación no sinónima en el gen del receptor de la Ectodisplasia A (EDAR). Este gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2 (2q11-13, posición: 108.894.471 - 108.989.372) (Fig. 4). Esta variante de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés: *single nucleotide polymorphism*), llamada también EDAR T1540C (rs3827760), consiste en el cambio de la base T por la base C en la posición 1540 desde el sitio de comienzo de la transcripción del gen, lo que lleva al cambio del aminoácido V (Valina) por una A (Alanina) en el aminoácido número 370 desde el codón de inicio en la traducción (Fujimoto et al. 2008).

Esta variante aminoacídica se encuentra en un dominio altamente conservado de la proteína que funciona como receptor en la superficie celular y activa la transcripción del factor NF-κB en la vía de la Ectodisplasia (Hlusko et al. 2018).

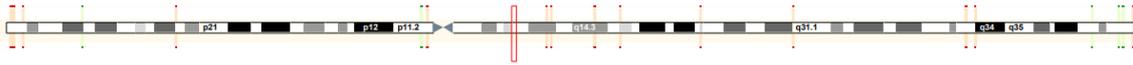


Figura 4. Ubicación en rojo del rs3827760 en el cromosoma 2
(<https://www.ensembl.org/info/about/publications.html>)

Este gen también está involucrado en formación de otras estructuras ectodérmicas, como por ejemplo cabello, glándulas sudoríparas y uñas (Kimura et al. 2009). Estudios comparativos muestran que la vía metabólica en la que participa el gen EDAR se encuentra conservada en todos los vertebrados y tiene un rol protagónico en la formación de las estructuras ectodérmicas, desde las plumas de los pájaros a las escamas en los peces (Hlusko et al. 2018)

En el trabajo de Park et al. (2012), donde también se estudiaron poblaciones asiáticas, concluyen que efectivamente el gen EDAR está involucrado en múltiples rasgos dentarios, particularmente el de diente en pala. De todas maneras, no excluyen el hecho de que existen otros factores participando y que la combinación de estos puede afectar de diferente manera a los rasgos.

Kimura et al. (2009) discuten sobre el efecto aditivo de los alelos del gen EDAR. El grado de diente en pala lo encuentran asociado al número de copias de la variante T1540C, siendo mayor para el genotipo CC (Fig. 5). El 18,9% de la varianza total de los grados de diente en pala está explicada por esta variante. Además, hallaron un SNP cercano: C1487T (rs12623957) que explica, aunque en menor medida, la gradación fenotípica del rasgo.

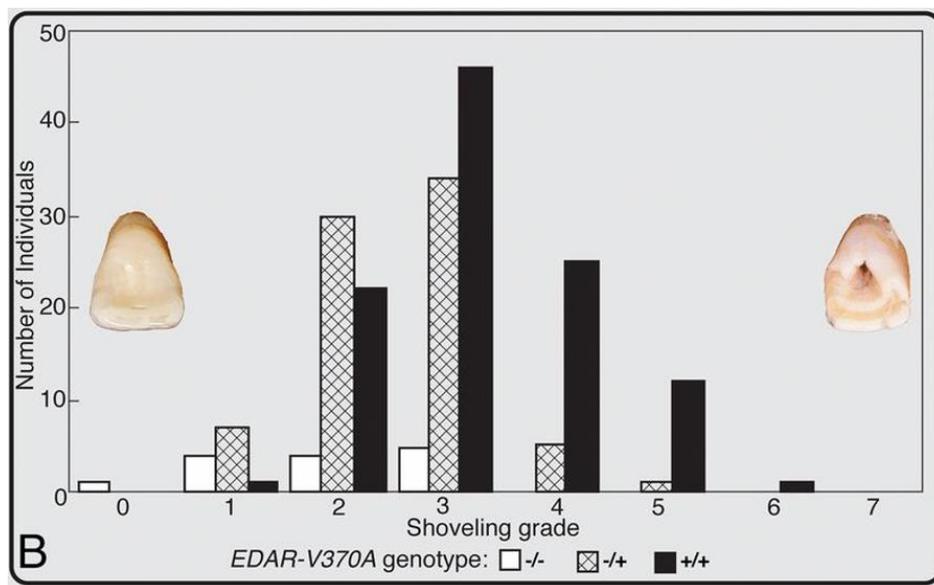


Figura 5. Histograma que relaciona el grado de diente en pala con el efecto aditivo de las copias de la variante T1540C. Tomado de (Hlusko et al. 2018)

Kimura et al. (2015) y Lee et al. (2012) hallan otros genes relacionados al rasgo diente en pala. Variantes de los genes PAX9 y WNT10A también participan en el desarrollo y formación de esta característica.

Por último, el gen EDAR está asociado a patologías que afectan las estructuras formadas por el ectodermo. Es uno de los cuatro genes involucrados en las displasias ectodérmicas: grupo heterogéneo de trastornos caracterizadas por la aplasia o hipoplasia de los derivados ectodérmicos. (García-Martín et al. 2013).

1.4 Selección sobre el gen EDAR

En el trabajo de Sabeti et al. (2007) hallaron que el gen EDAR se encuentra bajo selección natural positiva. En este estudio, realizado empleando la base de datos *International HapMap Project Phase 2*, se encontró que en las muestras de poblaciones asiáticas, la mutación que codifica el cambio V370A se encuentra en una frecuencia muy cercana a la fijación mientras que en las muestras de poblaciones europeas y africanas se encuentra ausente (Fig. 6).

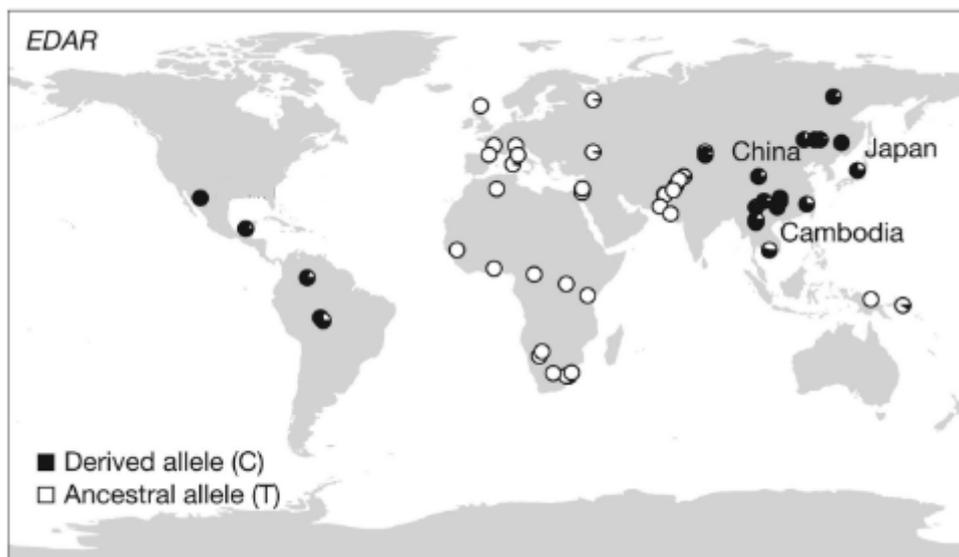


Figura 6. Distribución global de la variante EDAR V370A. Modificado de Sabeti et al. (2007)

Tanto Kimura et al. (2009) como Park et al. (2012) propusieron que, dada su alta frecuencia en poblaciones asiáticas del este, la variante EDAR V370A se encuentra bajo selección positiva. Kimura et al. (2009) plantearon que la variante se generó en una población asiática ancestral, donde fue seleccionada positivamente. Hipotetizaron además que la presión selectiva pueda deberse a que el mayor tamaño de los incisivos y el rasgo de diente en pala resultan en una mayor fuerza estructural en el diente que podría haber sido resultado de un cambio

adaptativo en la cultura, dado que estas poblaciones usan los dientes como herramientas. En concordancia, Park et al. (2012) indicaron que el objeto de la selección positiva podría haber sido la morfología del cabello, que estaría actuando en selección sexual. En este caso, la frecuencia de diente en pala sería un producto paralelo de esa selección.

Por otra parte, Hlusko et al. (2018) sostienen que existe una "barrida selectiva" sobre la variante durante el poblamiento de América debido a efectos pleiotrópicos en la secreción de vitamina D a la leche materna entre otros fenotipos asociados a la adaptación al frío extremo. El gen EDAR además de regular los procesos de formación de las estructuras ectodérmicas, también participa en la ramificación de los ductos de leche en la mama. El aumento de los ductos en la mama permitió una mayor cantidad de leche materna por la cual se podía transmitir mayor cantidad de nutrientes críticos a los infantes. Generalmente los marcadores moleculares utilizados en genética de poblaciones son esencialmente neutros, es decir que no tienen efecto sobre la eficacia biológica del individuo y por lo tanto no sufren selección (Holderegger et al. 2006). En este caso, la variante T1540C EDAR es muy posiblemente un marcador adaptativo ya que se cree que los efectos de las mutaciones observadas llevaron prácticamente a la fijación del alelo, conformando un proceso de selección positiva (Hlusko et al. 2018).

1.5 Características del ADN mitocondrial y determinación de haplogrupos

La mitocondria es un organelo que se encuentra en el citosol de las células eucariotas. Regula los mecanismos de generación de energía que se usan en los procesos metabólicos celulares y es transferida por linaje materno. Otra de sus características principales es que tiene genoma propio, con gran cantidad de copias y ADN circular de doble hebra con un tamaño aproximado de 16,6 Kb (Taanman, 1998).

Otras de las características fundamentales del ADN mitocondrial es que no recombina y tiene una alta tasa de mutación. Esta combinación de diferentes SNPs permite definir haplogrupos que son heredables. Estas mutaciones se acumulan principalmente en lo que se denomina región hipervariable (HVR). El ADN mitocondrial tiene 3 regiones hipervariables, siendo de interés en este estudio la I y la II. La HVR I comienza de la posición 16.024 a la 16.365 y la HVR II comienza de la posición 73 a la 340. (Amorim et al. 2019).

La primera secuencia completa del ADN mitocondrial fue publicada en 1981, por Anderson et al. siguiéndole una revisión en 1999, por Andrews et al. determinando así, la secuencia rCRS (*revised Cambridge Reference Sequence*), la cual es utilizada como referencia en el presente estudio.

Brown et al. (1980) caracterizaron algunos polimorfismos del ADN mitocondrial mediante el uso de endonucleasas de restricción. De este estudio surgen las primeras asociaciones hechas entre el estudio del genoma de las mitocondrias en humanos y la genética de poblaciones. En ese trabajo determinó los patrones (polimorfismos) compartidos entre las muestras analizadas, y también caracterizó los diferentes grupos de afinidad.

En 1987 se construyó un árbol filogenético, con 147 muestras de ADN mitocondrial de individuos de diferentes orígenes, lo que permitió inferir el ancestro común a todos los genomas mitocondriales: una mujer africana que posiblemente vivió hace 200.000 años (Cann et al. 1987). Numerosos estudios posteriores confirman el origen africano del *Homo sapiens*.

Particularmente en América, el estudio del ADN mitocondrial ha sido de gran importancia. Los trabajos de Torroni et al. (1992, 1993) determinaron 4 haplogrupos principales para las poblaciones americanas a los cuales se designó con las letras: A, B, C y D resueltos principalmente mediante la determinación por RFLP (por sus siglas en inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) de mutaciones en la HVR I.

En Kemp & Schurr (2010), la palabra haplogrupo o linaje se usan indistintamente para hacer referencia a un *cluster* filogenéticamente relacionado. Las ramas más pequeñas de un haplogrupo, las llamaron subhaplogrupo. A su vez, indican que el haplotipo es la secuencia única definida por RFLP. Un haplotipo, incluye todas las mutaciones que puedan ser determinadas por este método.

En el trabajo de Tamm et al. (2007) se enumeran detalladamente los haplogrupos americanos fundadores con sus correspondientes subhaplogrupos. Encuentran los cuatro haplogrupos fundadores panamericanos clásicos, a lo que llaman "mayores" (A2, B2, C1 y D1), y agregan además, otros dos: Dh43 y C4c. Definen también, tres haplogrupos norteamericanos, a los que llaman "menores" (X2a, D2 y D3). Concluyen que la oleada inicial fue una sola población ancestral, que estuvo aislada unos 15.000 años y que pobló rápidamente el nuevo mundo desde el norte hacia el sur. (Fig. 7)

Como consenso general, se acepta que en América del Sur existe una tendencia en la distribución de los haplogrupos. El haplogrupo X no se encuentra en Sudamérica, así como también las frecuencias de los haplogrupos A y B desciende cuanto más al sur nos encontremos, mientras que lo contrario sucede con los haplogrupos C y D, que aumentan su frecuencia en el sur (Perego et al. 2010; Tamm et al. 2007).

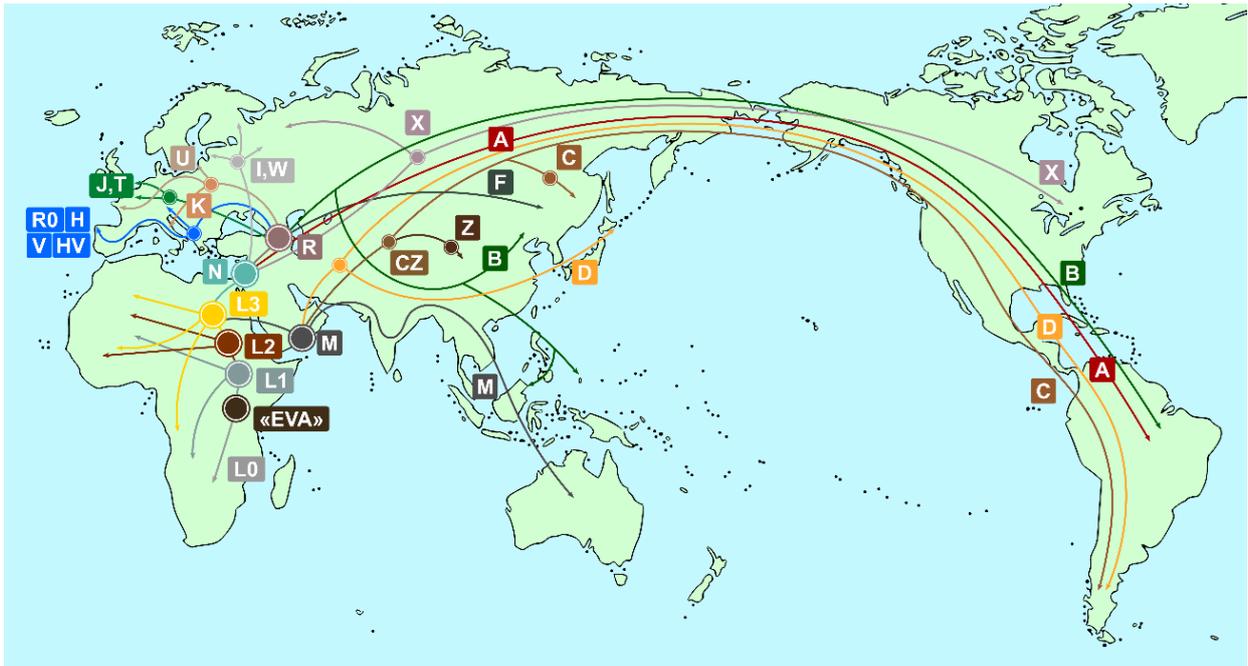


Figura 7. Ubicación geográfica de el origen de los diferentes haplogrupos mitocondriales. Se observan los primeros linajes provenientes del haplogrupo original africano y su subsecuente expansión hacia Europa y Asia, así como también, se distingue los haplogrupos americanos más recientes. Imagen tomada de Figueiro et al. (2021)

1.6 Ancestría indígena en Uruguay: estudios de ADN mitocondrial y marcadores biparentales

El ADN mitocondrial ha sido fundamental en el proceso de reconstrucción de la historia de las poblaciones. Este marcador uniparental es utilizado desde la década del 80 para determinar ancestría por línea materna.

Particularmente en Uruguay, a mitades de la década de los 90 se comenzaron a registrar datos para ADN mitocondrial, en principio, para poblaciones como Tacuarembó (Sans et al, 1997) y Cerro Largo (Sans et al. 2006). En Montevideo, los primeros datos de haplogrupos mitocondriales recién fueron publicados en Gascue et al. (2005). En este trabajo se registraron los cuatro haplogrupos mitocondriales indígenas principales mediante la técnica de RFLP. Se obtuvieron las siguientes frecuencias: 0,36 para A, 0,32 para B, 0,18 para C y 0,14 para D. Para la población de Tacuarembó, Bonilla et al. (2004) estima las siguientes frecuencias para la ancestría por ADN mitocondrial también por RFLP: 0,21 para A, 0,34 para B, 0,32 para C y 0,13 para D.

Otros trabajos publicados sobre poblaciones uruguayas son los de Sans et al. (2011) y Sans et al. (2015). En el primero, se estudiaron 60 descendientes de vascos en la ciudad de Trinidad (Flores) y se encontraron las siguientes proporciones de ancestría para el ADN mitocondrial:

77.8% europeo, 20.4% indígena y 1.8% africano, mostrando frecuencias similares a otras regiones del país. En el segundo trabajo se analiza a la población de Bella Unión en el norte de Uruguay. Las proporciones de ancestría encontradas son similares a las descritas para Tacuarembó, además se encontraron los cuatro haplogrupos fundadores, siendo el B2 el más frecuente.

En 2021 se publicó un extensivo trabajo que determinó los haplogrupos mitocondriales para una muestra de Montevideo. Los resultados obtenidos fueron los siguientes promedios: 24,6 % indígena, 67,7 % europeo, y 7,7 % africano (Sans et al. 2021). Para Tacuarembó, los datos más actuales que se tienen sobre ancestría determinada por ADN mitocondrial son los datos de una muestra de pacientes hipertensos (Flores, 2019) en la que se determinaron los siguientes porcentajes: 62,6% tiene origen indígena, seguido de un 29,3% europeo y un 8,1% africano. Los datos para ancestría indígena son muy similares a los obtenidos en Bonilla et al. (2004)

Por otra parte, también existen datos de ancestría sobre la base de marcadores biparentales, obtenidos del genoma nuclear. Para esto se utilizan determinados SNPs que se denominan AIMs (de sus siglas en inglés *Ancestry Informative Markers*), que brindan información biogeográfica por presentar diferencias marcadas en las frecuencias alélicas según su procedencia. Los patrones genéticos de diversidad más contrastantes ocurren a nivel intercontinental. La cantidad de AIMs utilizados pueden ser desde decenas a miles, dependiendo de la técnica de resolución utilizada. (Pardo-Seco et al. 2014). Existen datos para marcadores biparentales, tanto para Montevideo como para Tacuarembó. En primeras investigaciones, Sans et al. (1997) obtuvieron las siguientes frecuencias para la población de Tacuarembó: 65% europeo, 15% africano, y 20% indígena. Sans et al. (2021) encontraron los siguientes valores para Montevideo: 11,1% indígena, 81,4% europeo/mediterráneo, y 7,5% africano.

Por último, este año se publicó el primer trabajo que utilizó la secuenciación de genoma completo de 10 individuos uruguayos con ancestría indígena. Spangenberg et al. (2021) encontraron huellas genéticas indígenas específicas de nuestra población y también identificaron haplotipos que han sido blanco de selección positiva. Además, lograron delimitar temporalmente, en el año 1658, lo que sería el primer evento de mestizaje ocurrido entre indígenas y europeos.

2. Objetivos

La actual investigación propone contribuir con nuevos datos respecto al proceso de formación de la población uruguaya moderna y su relación con la microevolución de las poblaciones prehispánicas de nuestro territorio. Para esto se actualizarán los datos fenotípicos utilizados en los primeros estudios y se complementarán con análisis genéticos de ancestría utilizando los marcadores mitocondriales clásicos. Se pretende abordar la temática desde un ángulo no realizado hasta el momento y complementar así, con información genética, lo estudiado anteriormente.

En lo referente al fenotipo de "diente en pala", la población uruguaya se añadirá a otros estudios que plantean la asociación del alelo EDAR T1540C con el fenotipo diente en pala. En cuanto a los componentes de ancestría del Uruguay actual, la variante de EDAR T1540C será evaluada como marcador exploratorio de ancestría indígena para eventuales diseños de muestreo de estudios de mayor resolución. Por último, se obtendrá un estimativo de las frecuencias de la variante en estudio y se relacionarán las mismas con las de otras poblaciones del continente, estudiando las distancias genéticas y una posible estructura poblacional.

2.1 Objetivo general

Analizar la frecuencia de la variante EDAR T1540C en la población uruguaya y relacionar las frecuencias de esta variante con el rasgo de incisivo en pala y con marcadores moleculares de ancestría.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar dos muestras de la población uruguaya respecto a la variante T1540C del gen EDAR.

Asociar los datos obtenidos sobre la variante EDAR T1540 con otros marcadores de ancestría.

Comparar las frecuencias de la variante T1540C obtenidas con las halladas en otras poblaciones, e interpretar estas frecuencias en términos de procesos microevolutivos.

3. Hipótesis

En primer lugar, se plantea se existe relación entre el fenotipo de diente en pala y el alelo T1540C; es de interés saber si las personas que portan el alelo C presentan con mayor frecuencia el fenotipo diente en pala que aquellos que no lo portan.

En segundo lugar, se quiere determinar si existe relación entre la variante T1540C del gen EDAR y la ancestría indígena individual determinada por linaje materno. Es decir, ¿podría utilizarse la variante como indicador de ancestría indígena?

Y por último, estudiar la relación de las frecuencias de T1540C para distintas poblaciones y verificar si la frecuencia del alelo EDAR T1540C en la población uruguaya presenta correspondencia con lo esperado para una población mestiza americana.

4. Materiales y métodos

4.1 Muestras: recolección y grupos

Se utilizaron dos muestras diferentes. La primera muestra se compone de 100 individuos residentes en Montevideo. Los individuos fueron muestreados a partir de un llamado abierto y también participaron pacientes del servicio asistencial de la Facultad de Odontología, Udelar.¹

La muestra fue dividida en dos grupos: casos y controles. Las personas con el fenotipo de diente en pala (sin distinción de grado de expresión) se incluyeron en el grupo de casos. De estos, 25 individuos provienen del llamado abierto y 26 individuos provienen de la Facultad de Odontología, para un total de 51 casos. Las muestras de las personas sin el fenotipo de diente en pala forman el grupo de controles, estas muestras fueron obtenidas del llamado abierto y se completó un total de 49 controles.

De los individuos se obtuvo una muestra de saliva, recolectada en tubos estériles con medio conservante: "LIBO" (W Biomedical Tech, China). Las muestras se mantuvieron en heladera hasta su procesamiento. Todos los individuos dieron su consentimiento previo, libre e informado por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación (expediente N° 121900-000501-18).

La segunda muestra fue obtenida por el Polo de Diversidad Genética Humana (Centro Universitario de Tacuarembó, Udelar) en el marco del estudio: "Diversidad genética humana en la región nordeste del Uruguay" y fue analizada en conjunto con el Departamento de Antropología Biológica. Consta de 30 muestras, de personas nacidas la ciudad de Tacuarembó, Uruguay. De estos individuos ya se contaba con datos de haplogrupos mitocondriales y de ancestría biparental. No se cuenta con los datos sobre el fenotipo diente en pala para estos individuos.

4.2 Evaluación del rasgo morfológico

Los individuos que participaron en el estudio fueron examinados por observación directa. La característica fenotípica: diente en pala, fue clasificada según los procedimientos ASUDAS (*Arizona State University Dental Anthropology System*) descrito en Turner (1991). Se consideró integrar a este estudio, los individuos que portaran el rasgo a partir de la graduación 2

¹Gentileza de la Dra. Alicia Picapedra, quien trabaja en el Servicio de Registro y Admisión de Pacientes en la Facultad de Odontología, Udelar.

inclusive y se siguió la indicación de utilizar preferentemente, solo los incisivos centrales superiores.

4.3 Extracción de ADN

El ADN fue extraído utilizando el equipo de extracción automatizada *King Fisher Duo* (*Thermo Fisher Scientific*), con el kit de perlas magnéticas *MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*). Se siguió el protocolo *High throughput isolation of DNA from saliva*. Este protocolo utiliza 400 µl de saliva como partida, obteniéndose 50 µl de eluido final, con una concentración aproximada de entre 40 y 60 ng/µl.

4.4 Determinación de genotipos EDAR

La determinación de genotipos del *locus* EDAR se realizó por PCR en tiempo real utilizando sondas de hibridación *TaqMan*, que identifican el SNP rs3827760, variante del gen EDAR T1540C. La sonda está conformada para el alelo 1 (variante T) por el fluoróforo reportero VIC y el *quencher* MGB y para el alelo 2 (variante C) por el fluoróforo reportero FAM y el *quencher* MGB. La *Master Mix* utilizada fue la *Genotyping Master Mix* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*)

El protocolo de PCR en tiempo real fue realizado en el termociclador *Step One* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*). Con el siguiente ciclado de temperatura:

Primer paso de activación: 95°C por 10 minutos

Ciclado: 95°C por 10 segundos, paso de desnaturalización

63°C por 60 segundos, paso de hibridación. En esta etapa se realiza la lectura de los fluoróforos, la adquisición se realiza en el canal verde (FAM, variante C) y en el canal amarillo (VIC, variante T).

40 ciclos de repetición

Se utilizó un volumen final de 20 µl compuesto por los siguientes componentes para cada muestra: 10 µl de *Master Mix*, 1 µl de Sondas/Cebadores, 7 µl de H₂O y 2 µl de ADN de extraído.

4.5 PCR en tiempo final y secuenciación: determinación de los haplogrupos mitocondriales

Para la determinación de los haplogrupos mitocondriales se amplificó la región hipervariable I y la región hipervariable II (HVR I y HVR II respectivamente) utilizando la técnica de PCR en tiempo final.

Se utilizaron los siguientes pares de cebadores:

HVR I

Forward: 15997F 5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3' (Sans et al. 2011)

Reverse: 011R 5'-GCT GAG TGG TTA ATA GGG TGA TAG-3' (Sans et al. 2012)

HVR II

Forward: 16372F 5'-CCC TTC TCG TCC CCA TGG AT-3' (Kemp et al. 2007)

Reverse: 397R 5'-CAT ACC GCC AAA AGA TAA AAT-3' (Sans et al. 2011)

El perfil de temperatura utilizado fue el siguiente (Sans et al 2011):

Primer paso de activación: 94°C por 5 minutos

Ciclado: 94°C por 30 segundos, paso de desnaturalización

59°C para HVR I y 57°C para HVR II por 30 segundos, paso de hibridación

72°C por 40 segundos, paso de extensión

Paso final de extensión a 72°C por 5 minutos.

45 ciclos de repetición.

Se utilizó un volumen final de 25 µl compuesto por los siguientes volúmenes para cada muestra: 12,5 µl de *MasterMix* (Marca *ImmoMix™* de *Bioline*), 0,2 µl de *Primer Forward*, 0,2 µl de *Primer Reverse*, 10,1 µl de H₂O y 2 µl de ADN de extraído.

Para verificar los resultados de la PCR en tiempo final, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 0,5 X, teñido con GoodView (marca SBS Genetech). La corrida electroforética tuvo una duración de 40 minutos con un voltaje de 100V. La visualización fue realizada en un Transiluminador de luz ultravioleta.

Se degradaron los cebadores y dNTPs (de sus siglas en inglés, *deoxynucleotide triphosphates*) sobrantes de los productos de PCR obtenidos utilizando para cada muestra muestra 3 µl de fosfatasa alcalina con una concentración de 1 U/µl y 1,5 µl de Exonucleasa I con una concentración de 20 U/µl (ambas, marca *Thermo Fisher Scientific*). Se utilizó un protocolo de temperatura con los siguientes pasos: 30 minutos a 37°C y luego 15 minutos a 80°C, en baño seco.

La secuenciación fue realizada usando los mismos cebadores que los empleados para la PCR en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

Los archivos de cromatogramas obtenidos fueron analizados con el programa CHROMAS 2.6.6 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y editadas manualmente por cualquier ambigüedad no resuelta por el secuenciador.

Las secuencias obtenidas se alinearon con el software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y se utilizó como referencia, la secuencia de la región hipervariable de la secuencia de referencia revisada de Cambríger CRS_16001_460 publicada por Andrews et al. (1999).

Una vez alineadas, la determinación de los haplogrupos mitocondriales fue realizado con el *software online* Mitomaster. (<https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMASTER/WebHome>, Brandon et al. 2015).

4.6 Análisis de AIMs

Se utilizaron un total de 79 AIMs, genotipados en la plataforma de Sequenom MassArray (iPLEX® Gold, Pro Sample ID Panel, Agena Bioscience). Los 79 AIMs son un subconjunto de los utilizados en Galanter et al. (2012) para un estudio de ancestralidad realizado a distintas poblaciones americanas. Estos ensayos se realizaron en el Centro Nacional de Genotipado del Instituto de Salud Carlos III (CeGen-ISCI) de la Universidad de Santiago de Compostela, España. Estos mismos AIMs han sido utilizados en distintos estudios realizados en Uruguay (Flores (2019); Negro (2019)).

4.7 Análisis estadísticos

Las pruebas estadísticas utilizadas difieren parcialmente entre las muestras, ya que se pudieron obtener diferentes datos para cada una. En el caso de la muestra de Montevideo se contó los datos de fenotipo, genotipo EDAR y ancestría mitocondrial. Mientras que para la muestra de Tacuarembó no se tenían datos de fenotipo, por lo que se trabajó con genotipo EDAR, ancestría mitocondrial y datos de ancestría biparental.

En primer lugar, para ambas muestras, se realizaron test estadísticos de Chi Cuadrado (χ^2) para determinar la relación entre: genotipo, alelos, fenotipo y haplogrupo mitocondrial organizado de la siguiente manera:

4.7.1 Fenotipo

Las 100 muestras de Montevideo fueron analizadas mediante la prueba estadística de χ^2 para verificar la asociación del genotipo (TT, CT, CC) con el fenotipo (con o sin rasgo de diente en pala) y la asociación del alelo (T, C) con el fenotipo (con o sin rasgo de diente en pala). En particular para el segundo estudio, también se realizaron las pruebas de Fisher y *Odds Ratio* (OR) para estudiar la asociación entre portar un alelo o el otro con fenotipo analizado. En los casos donde el valor de probabilidad fue significativo ($p < 0,05$), también se verificó el índice V de Cramer, el cual es una medida de asociación entre variables nominales. Este índice varía entre los valores 0 y 1, indicando 0 independencia entre las variables analizadas y 1 una asociación completa.

También se estudiaron las 100 muestras de Montevideo mediante la prueba estadística de χ^2 para verificar la asociación del fenotipo (con o sin rasgo de diente en pala) con el haplogrupo mitocondrial. Para este estudio, los diferentes haplogrupos mitocondriales se agruparon en dos categorías: Indígena/americano + Asia del Este (IA + AE) y Europeo + Africano subsahariano (E + AS). El grupo Europeo incluye la zona del Mar Mediterráneo y Medio Oriente. Las agrupaciones de los haplogrupos se realizaron tomando en cuenta las frecuencias para estas poblaciones, dado que las frecuencias se encuentran casi fijadas para indígenas americanos y asiáticos y son nulas para las poblaciones europeas y africanas. Este análisis se realizó para verificar si existen diferencias significativas entre los portadores de un alelo o el otro y su ancestría por línea materna.

4.7.2 Haplogrupo mitocondrial

Tanto la muestra de Montevideo como de Tacuarembó fueron analizadas mediante la prueba estadística de χ^2 para verificar la asociación del genotipo con el haplogrupo mitocondrial. Para este estudio los diferentes haplogrupos mitocondriales también se agruparon en dos categorías: Indígena/americano + Asia del Este (IA + AE) y Europeo + Africano subsahariano (E + AS). Este análisis se realizó para verificar si existen diferencias significativas entre los diferentes genotipos y su ancestría por línea materna.

Para ambas muestras también se analizó la asociación de cada alelo (T, C) con el haplogrupo mitocondrial, mediante la prueba estadística de χ^2 . Los diferentes haplogrupos mitocondriales se agruparon en las mismas categorías que en las pruebas anteriores: Indígena/americano + Asia del Este (IA + AE) y Europeo + Africano subsahariano (E + AS). Este análisis se realizó

para verificar si existen diferencias significativas entre los portadores de un alelo o el otro y su ancestría por línea materna.

En segundo lugar, se realizaron análisis de distancias genéticas utilizando ambas poblaciones. Se generó una matriz utilizando medidas las distancias genéticas entre diferentes poblaciones y las dos muestras en estudio. También se realizó un test de AMOVA, con las poblaciones nombradas anteriormente.

4.7.3 Distancia genética con otras poblaciones

Luego de obtenidas las frecuencias alélicas, se realizó una comparación con otras bases de datos para establecer la distancia genética entre diferentes poblaciones. La base de datos utilizada fue 1000 *Genomes Project Phase 3*, obtenida de la página web: www.ensembl.org para el rs3827760 (Auton et al. 2015; Sudmant et al. 2015). También se sumó a la base de datos las frecuencias obtenidas en (Hünemeier et al. 2013), para la población indígena Totonacos de México (TOT) y mestizos de la ciudad de México (MEX) (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias alélicas para la variante de EDAR T1540C para distintas poblaciones.

	ID	N	Alelo T	Alelo C	Población
África	ACB	192	1	0	Caribe – africano en Barbados
	ASW	122	0,967	0,033	Ancestría africana en el suroeste de USA
	ESN	198	1	0	Esan, Nigeria
	GWD	226	1	0	Gambianos (división oeste)
	LWK	198	1	0	Luhya, Kenya
	MSL	170	1	0	Mende, Sierra Leona
	YRI	216	1	0	Yoruba, Nigeria
América	CLM	188	0,761	0,239	Colombianos, Medellín, Colombia
	MXL	128	0,516	0,484	Ancestría mexicana, Los Ángeles, California USA
	PEL	170	0,241	0,759	Peruanos, Lima, Perú
	PUR	208	0,827	0,173	Portorriqueños, Puerto Rico
	MEX	53	0,519	0,481	Mestizos de la Ciudad de México
	TOT	91	0.121	0.879	Totonacos de la sierra Norte de Puebla, México
Asia del Este	CDX	186	0,102	0,898	Chinos Dai, Xishuangbanna, China
	CHB	206	0,063	0,937	Chinos Han, Pekin, China

	CHS	210	0,095	0,905	Chinos Han del sur
	JPT	208	0,197	0,803	Japoneses, Tokio, Japón
	KHV	198	0,177	0,823	Kinh, Ho Chi Minh, Vietnam
Europa	CEU	198	1	0	Residentes de Utah con ancestría de Europa del norte y oeste
	FIN	198	0,944	0,056	Finlandeses, Finlandia
	GBR	182	1	0	Británicos, Inglaterra y Escocia
	IBS	214	1	0	Población Ibérica, España
	TSI	214	1	0	Toscana, Italia
Asia del Sur	BEB	172	0,948	0,052	Bengalí, Bangladesh
	GIH	206	0,985	0,015	Indios Gujarati en Houston Texas USA
	ITU	204	1	0	Indios Telugu en Reino Unido
	PJL	192	1	0	Punjabi, Lahore, Pakistán
	STU	204	0,995	0,005	Sri Lankan Tamil en Reino Unido

El programa utilizado para el análisis de las distancias entre las diferentes poblaciones fue Arlequín versión 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Se eligió particularmente el análisis mediante la distancia de Reynolds (Reynolds et al. 1983) que lineariza los diferentes F_{st} para tiempos cortos de divergencia. Los valores de F_{st} toman valores entre 0 y 1, a valores menores de F_{st} , menor diferenciación, a valores mayores, mayor diferenciación. Se utilizó los criterios de (Wright, 1965) para que diferencia a los F_{st} de la siguiente manera: de 0 a 0,05 diferencia pequeña, de 0,05 a 0,15 diferencia moderada, de 0,15 a 0,25 diferencia grande, y mayor a 0,25 diferencia muy grande.

Para visualizar los datos de distancias genéticas obtenidos se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés: *Principal Coordinates Analysis*), este método, reduce la variabilidad de los datos estableciendo un par de variables principales, las cuales representan el porcentaje de variabilidad de los datos originales que pueden ser representados gráficamente (Gower, 2015). Este análisis y representación se realizó en R versión 4.1.1.

4.7.4 Test de AMOVA

La prueba de AMOVA (por sus siglas en inglés: *Analysis of Molecular Variance*) es utilizada, como su nombre lo indica, para determinar la varianza molecular entre poblaciones y verificar si existe estructura poblacional. Utiliza las distancias genéticas para comparar la varianza intrapoblacional y la interpoblacional (Excoffier, 1992). Para este análisis se utilizó el programa Arlequín versión 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

Las poblaciones utilizadas son los listados en la Tabla 1. Las poblaciones de Montevideo y Tacuarembó fueron reasignadas a los 5 grupos utilizados: Asia del Este, Asia del Sur, África, Europa, y América para evaluar las variaciones intra e intergrupales.

Por último, se realizó únicamente para la muestra de Montevideo un test para determinar si la muestra se encontraba en equilibrio de Hardy Weinberg. De igual manera, se estudió únicamente para Tacuarembó la relación entre la ancestría biparental y los genotipos de EDAR.

4.7.5 Frecuencias alélicas y equilibrio de Hardy Weinberg

Dado que la muestra inicial de Montevideo consta con la mitad de los individuos con el rasgo y la otra mitad sin el diente en pala, se realizaron los siguientes cálculos para ponderar la frecuencia del fenotipo, utilizando la frecuencia obtenida para el rasgo, 35,5%, en Sassi et al. (2013) para una muestra de Montevideo. Se obtuvo mediante 2000 repeticiones (con un $n = 27$, cantidad correspondiente al 35,5% del total de los casos) con reposición una distribución de la frecuencia alélica de T1540C. Esto permitió generar una muestra representativa con la frecuencia esperada en la población. Luego, se calculó el intervalo de confianza al 95% de las frecuencias alélicas y genotípicas mediante el paquete HardyWeinberg en R (R versión 4.1.1, R Core Team, 2021), y con estas se estudió si la población se encuentra en equilibrio de Hardy – Weinberg con el mismo paquete. Se estudió además, si las muestras separadas por fenotipo también se encontraban en equilibrio.

4.7.6 Alelo vs ancestría biparental

Puesto que para esta muestra se tienen los datos de proporción de ancestría biparental, africana, europea y americana, se contrastó la misma con el genotipo para el gen EDAR mediante la prueba de Wilcoxon. La prueba de Wilcoxon es una prueba no paramétrica que se utilizó para comparar si existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de ancestría biparental: AFRO (africana), EURO (europea) y NATIVO (indígena) y los alelos de la variante de EDAR, y se empleó, puesto que los valores de ancestría no presentaban una distribución normal. Se realizó la corrección de Bonferroni para ajusta el umbral de significación cuando se utilizan varias pruebas estadísticas simultáneamente. Por esto, el valor de α usado frecuentemente (0,05) fue dividido entre tres, debido a los tres test de Wilcoxon utilizados para el análisis de los diferentes grupos de ancestría. El nuevo valor de significación utilizado fue $\alpha=0,016$.

5. Resultados

5.1 Muestra de Montevideo. Individuos de la muestra caso-control

Se recogieron en la tabla 2 los resultados obtenidos para los análisis de PCR en tiempo real para determinar el alelo EDAR, los resultados de la resolución del haplogrupo mitocondrial y la clasificación utilizada para realizar los análisis estadísticos en el presente estudio.

Tabla 2. Individuos de la muestra de Montevideo (casos y controles) con los respectivos resultados respecto a los alelos del gen EDAR y la clasificación de ancestría propuesta para este estudio según su haplogrupo mitocondrial. IA + AE = Indígena/americano + Asia del Este; E + AS = Europeo + Africano subsahariano; ND = no disponible.

ID	Caso/Control	Nacimiento	Alelo 1	Alelo 2	Haplogrupo	Clasificación
DEP8970	Control	Montevideo	T	C	C1	IA + AE
DEP3196	Control	Montevideo	T	T	C1	IA + AE
DEP9167	Control	Montevideo	T	T	H6	E + AS
DEP7583	Control	Maldonado	T	C	T2c	E + AS
DEP3550	Control	Montevideo	T	C	J1c2	E + AS
EA	Control	Montevideo	T	C	H2a2a1	E + AS
PM	Control	Montevideo	T	C	L0a2	E + AS
MS	Control	Montevideo	T	T	H	E + AS
DEP3077	Control	Montevideo	T	T	A2	IA + AE
DEP6995	Control	Rivera	T	C	B2s	IA + AE
DEP4508	Control	Montevideo	T	T	C1b	IA + AE
DEP5534	Control	Montevideo	T	T	H7f	E + AS
DEP5544	Control	Montevideo	T	T	W	E + AS
DEP7188	Control	Montevideo	T	T	A2	IA + AE
DEP5752	Control	Montevideo	T	T	U5b	E + AS
DEP2437	Control	Montevideo	T	T	T1a	E + AS
DEP0491	Control	Montevideo	T	T	L2a	E + AS
DEP8855	Control	Montevideo	T	T	A2	IA + AE
DEP8778	Control	Montevideo	T	T	H1c	E + AS
DEP5482	Control	Canelones	T	T	U4a	E + AS
DEP6200	Control	Montevideo	T	T	L3d	E + AS
DEP1211	Control	Montevideo	T	T	B2b	IA + AE
DEP5190	Control	Montevideo	T	T	H2a	E + AS
DEP5909	Control	Soriano	T	T	B2i	IA + AE
DEP2570	Control	Montevideo	T	T	T1b	E + AS
DEP7288	Control	Montevideo	T	T	C1d	IA + AE

DEP1201	Control	Montevideo	T	T	R1	E + AS
DEP9324	Control	Montevideo	T	C	A2	IA + AE
DEP8393	Control	Montevideo	T	T	T2c	E + AS
DEP4828	Control	Paysandú	T	T	A2	IA + AE
DEP5487	Control	Montevideo	T	T	H1c	E + AS
DEP6607	Control	Montevideo	T	T	V3a	E + AS
DEP0182	Control	Soriano	T	T	T2b	E + AS
DEP1282	Control	Montevideo	T	T	H2a	E + AS
DEP3238	Control	Soriano	T	T	L2a	E + AS
DEP8038	Control	San José	T	T	V	E + AS
DEP7393	Control	Colonia	T	T	D1j	IA + AE
DEP8214	Control	Montevideo	T	T	K1c	E + AS
DEP9236	Control	Montevideo	T	C	C1	IA + AE
DEP6562	Control	Montevideo	T	T	M1a	E + AS
DEP7135	Control	Montevideo	T	T	H27	E + AS
DEP5298	Control	Treinta y Tres	T	T	B4	IA + AE
DEP1823	Control	ND	T	T	D1f	IA + AE
DEP4915	Control	Montevideo	T	T	W	E + AS
DEP7184	Control	Montevideo	T	T	H5t	E + AS
DEP7063	Control	Rivera	T	C	C1	IA + AE
DEP7566	Control	Colonia	T	T	C1d	IA + AE
DEP1834	Control	Montevideo	T	T	A2	IA + AE
DEP0965	Control	ND	T	T	U6a	E + AS
DEP1	Caso	ND	C	C	J1c	E + AS
DEP6918	Caso	ND	T	C	D1j	IA + AE
DEP9235	Caso	ND	T	T	A2	IA + AE
DEP3715	Caso	Montevideo	T	T	A2	IA + AE
DEP4146	Caso	ND	T	C	C1	IA + AE
DEP8695	Caso	ND	T	T	C1	IA + AE
DEP5760	Caso	ND	T	T	H33	E + AS
DEP3401	Caso	Montevideo	T	T	A2	IA + AE
DEP0008	Caso	Montevideo	T	T	K1c	E + AS
DEP2897	Caso	Montevideo	T	C	B4	IA + AE
DEP1095	Caso	Montevideo	T	T	C1	IA + AE
DEP4069	Caso	Montevideo	T	C	C1d	IA + AE
DEP7675	Caso	Montevideo	T	T	U5a2C	E + AS
DEP8295	Caso	Montevideo	T	C	H6a	E + AS
DEP3932	Caso	Montevideo	T	T	T	E + AS
DEP8881	Caso	Montevideo	T	T	D1	IA + AE

DEP0737	Caso	Montevideo	T	C	B2b	IA + AE
DEP3852	Caso	Montevideo	T	T	H1e	E + AS
DEP2243	Caso	Montevideo	T	C	C1	IA + AE
DEP8233	Caso	Montevideo	T	T	I3a	E + AS
DEP7478	Caso	Florida	T	C	HV0	E + AS
DEP23	Caso	ND	T	T	B2c	IA + AE
DEP1968	Caso	Montevideo	T	T	H2a	E + AS
DEP4609	Caso	Montevideo	T	T	T2a1a5	E + AS
DEP1945	Caso	Montevideo	T	T	B4	IA + AE
DEP0409	Caso	Montevideo	T	T	T2c1	E + AS
DEP7299	Caso	Montevideo	T	C	B2s	IA + AE
DEP4050	Caso	Montevideo	C	C	C1	IA + AE
DEP8776	Caso	Montevideo	T	C	H1	E + AS
DEP3922	Caso	Rocha	T	T	T2	E + AS
DEP7009	Caso	Montevideo	T	T	U2e	E + AS
DEP9971	Caso	Flores	T	C	D1	IA + AE
DEP9099	Caso	Montevideo	T	T	A2	IA + AE
DEP9642	Caso	Montevideo	T	C	B2	IA + AE
DEP2184	Caso	Salto	T	C	A2	IA + AE
DEP8490	Caso	Durazno	T	T	H1b	E + AS
DEP0727	Caso	Montevideo	T	T	U5a	E + AS
DEP6094	Caso	Montevideo	T	T	HV0	E + AS
DEP7187	Caso	Montevideo	T	T	K1a	E + AS
DEP0017	Caso	Montevideo	T	T	H14b1	E + AS
DEP4065	Caso	Montevideo	T	C	H2a2a2	E + AS
DEP5185	Caso	Treinta y Tres	C	C	C1	IA + AE
DEP9066	Caso	ND	T	C	C1d	IA + AE
DEP5208	Caso	ND	T	C	B2s	IA + AE
DEP0101	Caso	Montevideo	T	C	HV1	E + AS
DEP0294	Caso	ND	T	T	L2a	E + AS
DEP2586	Caso	Canelones	T	C	H2a	E + AS
DEP2894	Caso	Maldonado	T	T	U5a	E + AS
DEP6644	Caso	Montevideo	T	T	J1c	E + AS
DEP6332	Caso	Montevideo	T	C	C1d	IA + AE
DEP6366	Caso	Montevideo	T	C	A2	IA + AE

Los análisis estadísticos que se presentan a continuación fueron realizados con el conteo directo (tanto de alelo como de genotipos) de los datos de la Tabla 2. Fenotipo refiere a la presencia de la característica de diente en pala (caso) o la ausencia (control). Para el grupo IA

+ AE, se consideraron haplogrupos mitocondriales A, B, C y D y para el grupo E + AS a todo el resto de los haplogrupos mitocondriales.

5.1.1 Análisis del genotipo vs el fenotipo

Tabla 3. Genotipos para los rasgos con y sin diente en pala de la muestra de Montevideo.

	Genotipo			Total
	TT	TC	CC	
Con diente en pala	28	20	3	51
Sin diente en pala	40	9	0	49
Total	68	29	3	100

A partir de los datos de la tabla 3, se realizó una prueba de χ^2 (gl= 2; $\alpha=0,05$). El valor de χ^2 obtenido fue 9,2538 y el p-valor = 0,009785 denotando que existe relación significativa entre el genotipo y el fenotipo.

El valor V de Cramer es 0,3, indicando una asociación moderada.

5.1.2 Análisis del alelo vs el fenotipo

Tabla 4. Frecuencias alélicas para los rasgos con y sin diente en pala de la muestra de Montevideo.

	Alelo		Total
	T	C	
Con diente en pala	76	26	102
Sin diente en pala	89	9	98
Total	165	35	200

Se utilizaron los datos de la tabla 4 para realizar una prueba de χ^2 (gl=1; $\alpha=0,05$). El valor de χ^2 obtenido fue 8,1103 y el p-valor = 0,004402. denotando que existe relación significativa entre el alelo y el fenotipo.

El valor V de Cramer es 0,21, indicando una asociación moderada.

5.1.2.1 Test de Fisher

Los valores de la tabla 4 también fueron utilizados para realizar un test de Fisher ($\alpha=0,05$). El p-valor obtenido fue 0,002748 por lo que las variables alelo y fenotipo son dependientes una de otra.

5.1.2.2 Odds Ratio

El valor de OR obtenido con los valores de la tabla 4 fue 0,2973454, que difiere significativamente de 1, con un intervalo de confianza de (0,1152065; 0,7041184). El *Risk Ratio* es 3,3636. Este coeficiente mide la relación entre las variables, en este caso, el tener la variable, o alelo C, hace que la probabilidad de tener diente en pala sea 3,36 veces mayor.

5.1.3 Análisis del fenotipo vs el haplogrupo mitocondrial

Tabla 5. Haplogrupos mitocondriales para los rasgos con y sin diente en pala de los individuos de la muestra de Montevideo.

	Haplogrupo IA + AE	Haplogrupo E + AS	Total
Con diente en pala	25	26	51
Sin diente en pala	19	30	49
Total	44	56	100

Los datos que se muestran en la tabla 5 fueron utilizado para realizar una prueba de χ^2 (gl=1; $\alpha=0,05$). El valor de χ^2 obtenido fue 0,69 y el p-valor = 0,4062 por lo tanto no existe relación entre el haplogrupo mitocondrial y el fenotipo.

5.1.4 Análisis del genotipo vs el haplogrupo mitocondrial

Tabla 6. Frecuencias de haplogrupos mitocondriales para los genotipos de EDAR de la muestra de Montevideo.

	Haplogrupo IA + AE	Haplogrupo E + AS	Total
TT	23	45	68
TC	19	10	29
CC	2	1	3
Total	44	56	100

La información incluida en la tabla 6 se utilizó para realizar una prueba de χ^2 (gl=2; y $\alpha=0,05$). El valor de χ^2 obtenido fue 8,93 y el p-valor = 0,0115 por lo tanto, existe relación entre el genotipo y el haplogrupo mitocondrial.

El valor V de Cramer es 0,29, indicando una asociación moderada.

5.1.5 Análisis del alelo vs el haplogrupo mitocondrial

Tabla 7. Haplogrupos mitocondriales para los alelos de los individuos de la muestra de Montevideo.

	Haplogrupo IA + AE	Haplogrupo E + AS	Total
T	65	100	165
C	23	12	35
Total	88	112	200

Se utilizaron los datos de la tabla 7 para realizar una prueba de χ^2 (gl=1; $\alpha=0,05$). El valor de χ^2 obtenido fue 7,09 y el p-valor = 0,0078. denotando que existe relación significativa entre el alelo y el haplogrupo mitocondrial.

El valor V de Cramer es 0,20, indicando una asociación moderada.

Las frecuencias relativas de los datos de las pruebas estadísticas realizadas anteriormente se resumen de forma gráfica en la figura 8.



Figura 8. Visualización gráfica de las frecuencias relativas de los datos utilizados para las pruebas estadísticas de la muestra de Montevideo. A. Genotipo vs fenotipo. B. Alelo vs fenotipo. C. Fenotipo vs haplogrupo mitocondrial. D. Alelo vs haplogrupo mitocondrial. E. Genotipo vs haplogrupo mitocondrial.

5.1.6 Análisis de las frecuencias alélicas y el equilibrio Hardy-Weinberg

En la tabla 8 se muestran los valores de las frecuencias alélicas de los dos alelos obtenidas de los remuestreos, mostrando los valores del 95% de los datos (media con dos desvíos estándar) y particularmente en los percentiles 2,5, 50 y 97,5 respectivamente. Las frecuencias alélicas halladas para el percentil 50 son: para el alelo C = 0,15 y para el alelo T = 0,85. Estas frecuencias fueron utilizadas para los análisis de las distancias genéticas y AMOVA.

Tabla 8. Valores de las frecuencias alélicas en los percentiles 2,5; 50 y 97,5 de los alelos de EDAR para la muestra representativa obtenida por remuestreo a partir de la muestra de Montevideo.

	P 2,5	P 50	P 97,5
Frecuencia alelo C	0,1250000	0,1513158	0,1776316
Frecuencia alelo T	0,8223684	0,8486842	0,8750000

Para determinar si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, se realizó una prueba de χ^2 (gl=2; $\alpha=0,05$). Los siguientes, corresponden a los valores mínimos de χ^2 y su p valor correspondiente obtenido entre los 2000 remuestreos: $\chi^2 = 0,007663679$ y p-valor = 0,1740528. La diferencia es no significativa y por lo tanto la muestra se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg.

También se realizó la prueba de χ^2 para determinar equilibrio en cada grupo por separado. Para las muestras con fenotipo diente en pala la diferencia es no significativa ($\chi^2 = 0,025021$; p-valor = 0,9876). De igual manera, para las muestras sin fenotipo de diente en pala, la diferencia es no significativa ($\chi^2 = 0,4392$; p-valor = 0,8028). Por lo que ambas muestras se encuentran también en equilibrio.

5.1.7 Análisis de las distancias genéticas con otras poblaciones

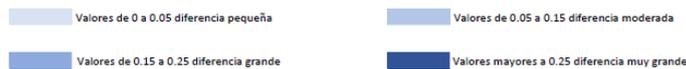
La visualización gráfica del análisis de las distancias genéticas calculado con las Fst de Reynolds y realizado con el software Arlequín se muestra en la figura 9.

Las mayores diferencias se ven entre las poblaciones de Asia del Este y África, las poblaciones de Asia del Este y Asia del Sur y las poblaciones de Asia del Este y Europa. Todos los pares de poblaciones analizadas en estas regiones tienen un índice de diferenciación de Wright mayor

a 0,26. En menor grado de diferenciación, siguen las poblaciones de América y las poblaciones africanas y europeas y las poblaciones de Asia del Sur, con las poblaciones americanas.

En particular, la muestra de Montevideo (UYU) tiene sus mayores diferencias con todas las poblaciones de Asia del Este y en particular con las poblaciones: Totonacos de la sierra Norte de Puebla, México y peruanos de Lima, Perú. La muestra de Tacuarembó (TAC) presenta sus mayores diferencias con las poblaciones africanas y también con los Totonacos de la sierra Norte de Puebla, México y peruanos de Lima, Perú. Al igual que Montevideo (UYU) tiene un índice de diferenciación mayor a 0,25 con todas las poblaciones de Asia del Este y también con Gran Bretaña (GBR), Población ibérica, España (IBS) y Toscana, Italia (TSI) de Europa. También con Indios Telugu en Reino Unido (ITU), Punjabi, Pakistán (PJI) y Sri Lanka en Reino Unido (STU) de Asia del sur.

		África						América								
		ACB	ASW	ESN	GWD	LWK	MSL	YRI	CLM	MXL	PEL	PUR	MEX	TOT	UYU	TAC
África	ACB	-														
	ASW	0,0354	-													
	ESN	0,0000	0,0362	-												
	GWD	0,0000	0,0401	0,0000	-											
	LWK	0,0000	0,0362	0,0000	0,0000	-										
	MSL	0,0000	0,0322	0,0000	0,0000	0,0000	-									
América	YRI	0,0000	0,0387	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-								
	CLM	0,2373	0,1422	0,2402	0,2537	0,2402	0,2262	0,2490	-							
	MXL	0,5371	0,4109	0,5418	0,5625	0,5418	0,5191	0,5553	0,1196	-						
	PEL	0,7688	0,6853	0,7718	0,7845	0,7718	0,7574	0,7801	0,4218	0,1452	-					
	PUR	0,1634	0,0821	0,1655	0,1754	0,1655	0,1553	0,1719	0,0084	0,2037	0,5132	-				
	MEX	0,6705	0,4904	0,6759	0,6885	0,6759	0,6490	0,6911	0,1102	-0,0132	0,1619	0,2044	-			
	TOT	0,9182	0,8478	0,9198	0,9264	0,9198	0,9118	0,9241	0,5620	0,2840	0,0362	0,6515	0,3334	-		
	UYU	0,2230	0,0756	0,2270	0,2454	0,2270	0,2077	0,2390	0,0173	0,2133	0,5296	-0,0061	0,2213	0,6988	-	
Asia del Este	TAC	0,3527	0,0763	0,3591	0,3874	0,3591	0,3280	0,3776	0,0127	0,2004	0,5239	-0,0137	0,2013	0,7140	-0,0233	-
	CDX	0,8988	0,8453	0,9002	0,9064	0,9002	0,8932	0,9043	0,6105	0,3495	0,0614	0,6869	0,4114	-0,0064	0,7352	0,7517
	CHB	0,9345	0,8924	0,9354	0,9394	0,9354	0,9309	0,9380	0,6721	0,4330	0,1163	0,7409	0,5200	0,0144	0,8024	0,8279
	CHS	0,9004	0,8509	0,9018	0,9075	0,9018	0,8952	0,9055	0,6255	0,3698	0,0711	0,6990	0,4980	-0,0044	0,7483	0,7656
	JPT	0,7956	0,7251	0,7980	0,8086	0,7980	0,7862	0,8050	0,4810	0,2031	0,0004	0,5662	0,2285	0,0122	0,5892	0,5893
	KHV	0,8779	0,7457	0,8302	0,8302	0,8202	0,8089	0,8268	0,5029	0,2248	0,0056	0,5877	0,2548	0,0050	0,6143	0,6164
Europa	CEU	0,0000	0,0362	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2402	0,5418	0,7718	0,1655	0,6759	0,9198	0,2270	0,3591
	FIN	0,0499	-0,0008	0,0508	0,0548	0,0508	0,0466	0,0534	0,1230	0,4107	0,6851	0,0606	0,4742	0,8289	0,0436	0,0293
	GBR	0,0000	0,0339	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2323	0,5291	0,7638	0,1597	0,6611	0,9154	0,2161	0,3417
	IBS	0,0000	0,0384	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2480	0,5539	0,7792	0,1712	0,6895	0,9237	0,2377	0,3756
	TSI	0,0000	0,0384	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2480	0,5539	0,7792	0,1712	0,6895	0,9237	0,2377	0,3756
Asia del Sur	BEB	0,0500	-0,0025	0,0509	0,0552	0,0509	0,0465	0,0537	0,1235	0,4048	0,6810	0,0625	0,4709	0,8303	0,0468	0,0339
	GIH	0,0091	0,0014	0,0094	0,0107	0,0094	0,0080	0,0102	0,2072	0,5105	0,7522	0,1330	0,6226	0,8972	0,1546	0,1922
	ITU	0,0000	0,0370	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2432	0,5464	0,7746	0,1677	0,6811	0,9213	0,2311	0,3654
	PJI	0,0000	0,0354	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2373	0,5371	0,7688	0,1634	0,6705	0,9182	0,2330	0,3527
	STU	-0,0003	0,0190	-0,0002	0,0005	-0,0002	-0,0009	0,0003	0,2303	0,5337	0,7668	0,1551	0,6604	0,9130	0,2014	0,2906



Asia del Este					Europa					Asia del Sur							
CDX	CHB	CHS	JPT	KHV	CEU	FIN	GBR	IBS	TSI	BEB	GIH	ITU	PJI	STU			
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ACB	África
0,0050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ASW	
-0,0048	0,0023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ESN	
0,0294	0,0717	0,0362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GWD	
0,0197	0,0584	0,0255	-0,0041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LWK	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MSL	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	YRI	América
0,3002	0,9354	0,9018	0,7980	0,8202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CLM	
0,8314	0,8736	0,8370	0,7222	0,7441	0,0508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MXL	
0,8963	0,9329	0,8981	0,7914	0,8139	0,0000	0,0484	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PEL	
0,9038	0,9377	0,9051	0,8042	0,8261	0,0000	0,0531	0,0000	0,0000	0,0000	-	-	-	-	-	-	PUR	
0,9038	0,9377	0,9051	0,8042	0,8261	0,0000	0,0531	0,0000	0,0000	0,0000	0,0101	0,0101	0,0177	-	-	-	MEX	
0,8324	0,8765	0,8382	0,7194	0,7418	0,0509	-0,0054	0,0484	0,0534	0,0534	-	-	-	-	-	-	TOT	
0,8837	0,9201	0,8862	0,7809	0,8028	0,0094	0,0200	0,0086	0,0101	0,0101	0,0177	-	-	-	-	-	UYU	
0,9016	0,9363	0,9031	0,8004	0,8224	0,0000	0,0516	0,0000	0,0000	0,0000	0,0518	0,0097	-	-	-	-	TAC	
0,8988	0,9345	0,9004	0,7956	0,8179	0,0000	0,0499	0,0000	0,0000	0,0000	0,0500	0,0091	0,0000	-	-	-	CDX	
0,8954	0,9308	0,8973	0,7936	0,8156	-0,0002	0,0386	-0,0006	0,0002	0,0002	0,0374	-0,0001	0,0000	-0,0003	-	-	CHB	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CHS	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	JPT	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	KHV	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CEU	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FIN	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GBR	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IBS	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TSI	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BEB	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GIH	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ITU	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PJI	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	STU	

Figura 9. Visualización gráfica de la diferencia de valores de F_{st} en función de las categorías propuestas por Wright (1978). Comparación par a par de las poblaciones estudiadas, agrupada por origen común (ver tabla 1 para la definición de las siglas).

Cabe destacar en este sentido, la similitud de las frecuencias (diferencias pequeñas, con índice de Wright menor a 0,05) entre las poblaciones de África y Europa y África y Asia del sur, así como también Europa y Asia del sur.

Por último, las poblaciones de Montevideo y Tacuarembó entre sí tienen un F_{st} de -0,0233, por lo que presentan una diferencia entre sí muy pequeña.

En el análisis de PCoA (Fig. 10), se concentran el 91% de la variabilidad de los datos. Particularmente, en el eje x se muestra el 84% de la variabilidad total de los mismos. Las muestras estudiadas: Montevideo (UYU) y Tacuarembó (TAC), se encuentran más cercanas a las poblaciones de Puerto Rico (PUR) y Colombia (CLM).

Por otra parte, se encuentran dos grupos claramente definidos: a la izquierda, el grupo que incluye a todas las poblaciones africanas, europeas y del sur de Asia. Separados en un primer *cluster*: Caribe – africano en Barbados (ACB), Nigeria (ESN), Kenia (LWK), Yoruba (YRI), Residentes de Utah con ancestría de Europa del norte y oeste (CEU), población Ibérica, España (IBS), Toscana, Italia (TSI), Indios Gujarati en Houston Texas, USA (GIH), Punjabi, Pakistán (PJI), Mende, Sierra Leona (MSL), Gran Bretaña (GBR), Sri Lanka en Reino Unido (STU), Indios Telugu en Reino Unido (ITU) y Gambia (GWD). Y, muy cerca de este subgrupo, pero bien diferenciados en otro *cluster*, se encuentran las siguientes tres poblaciones: Ancestría africana en suroeste de USA (ASW), Bengalí, Bangladesh (BEB) y Finlandia (FIN).

Luego, en la parte central, también se diferencian dos grupos: a la derecha: Montevideo (UYU), Tacuarembó (TAC), Puerto Rico (PUR) y Colombia (CLM), y a la izquierda se diferencian las poblaciones mexicanas Ancestría mexicana, Los Ángeles, California (MXL) y mestizos de la ciudad de México (MEX).

Por último, a la derecha, se encuentra el grupo conformado por las siguientes poblaciones indígenas y de Asia del Este: Perú (PEL), Totonacos, México (TOT), Kinh, Ho Chi Minh, Vietnam (KHV), Tokio, Japón (JPT), chinos Dai (CDX), Chinos Han, sur de China (CHS) y Chinos Han, Pekín, China (CHB).

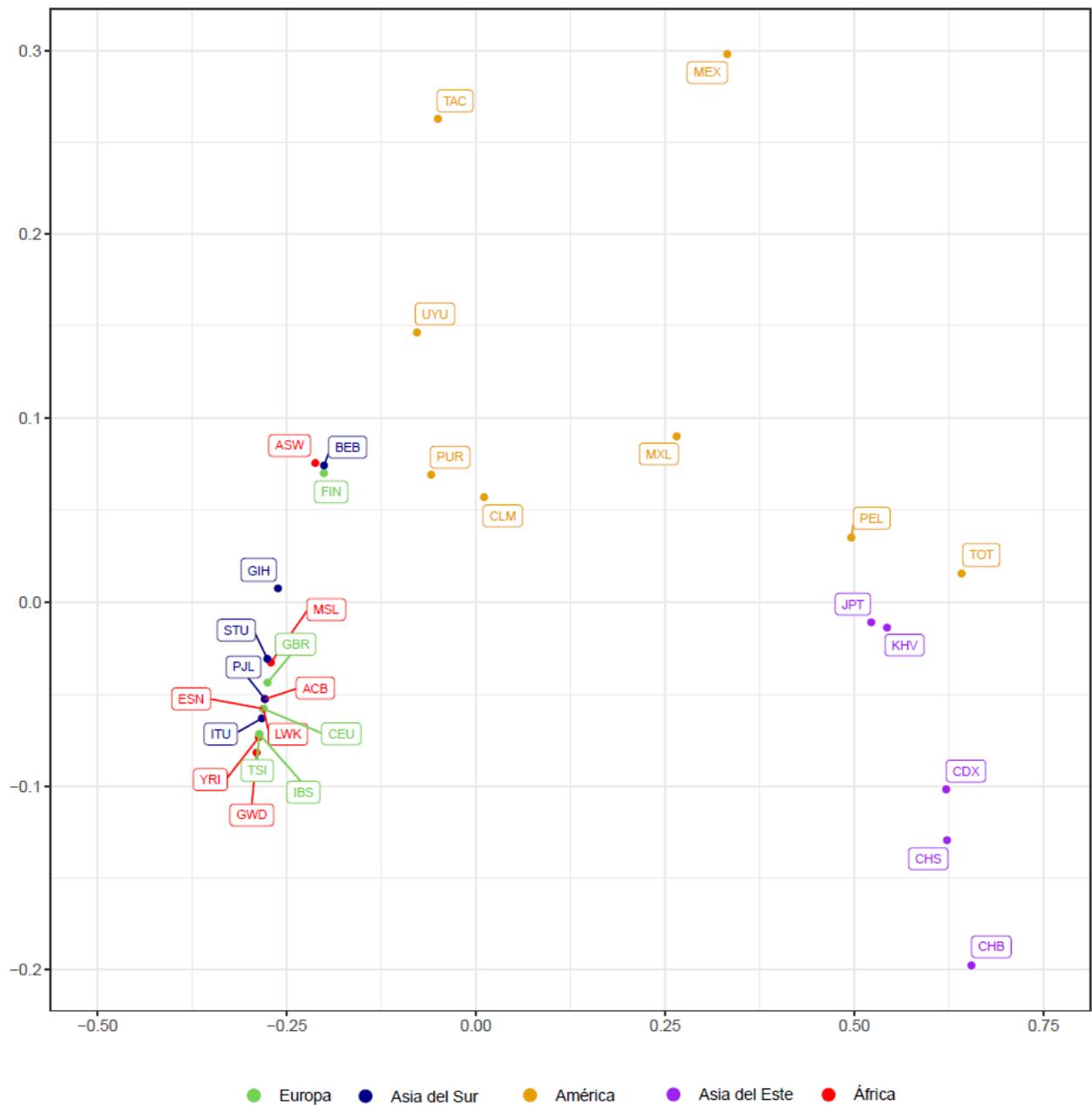


Figura 10. Representación visual del análisis de coordenadas principales para las 30 poblaciones y sus respectivos orígenes continentales (ver tabla 1 para la definición de las siglas).

5.1.8 AMOVA

En la tabla 9 se encuentran los valores del test AMOVA realizado. Se utilizaron dos configuraciones, la primera en la que no se incluyeron las poblaciones de Montevideo (UYU) y Tacuarembó (TAC). En la segunda, UYU y TAC se incorporaron como un sexto grupo, siendo los otros cinco, las divisiones utilizadas en la tabla 1: Europa, América, África, Asia del Este y Asia del Sur, con sus respectivas poblaciones.

Tabla 9. Valores obtenidos en el test AMOVA utilizando dos configuraciones: una sin UYU ni TAC y la otra con UYU y TAC como grupo independiente.

	Entre grupos	Entre poblaciones dentro grupos	Intragrupos	p valor
Distribución sin UYU y TAC	67,82	6,56	25,63	< 0,0001
Distribución con UYU y TAC como grupo independiente	66,79	6,58	26,63	< 0,0001

Para determinar cuál es la configuración óptima, los valores de varianza deben ser aquellos en los que disminuyen las distancias entre poblaciones dentro de los grupos y aumente la distancia entre los grupos. En este caso, las diferencias son mínimas, lo que no permite una determinación concluyente.

5.2 Muestra de Tacuarembó

Se recogen en la tabla 10 los resultados obtenidos para los análisis de PCR en tiempo real para determinar el alelo EDAR, los resultados de la resolución el haplogrupo mitocondrial, los datos de marcadores biparentales y la clasificación utilizada para realizar los análisis estadísticos llevados en el presente estudio.

Tabla 10. Individuos de la muestra Tacuarembó con los respectivos resultados respecto a los alelos del gen EDAR, la clasificación de ancestría propuesta para este estudio según su haplogrupo mitocondrial y los valores de los marcadores de ancestría biparental.

ID	Nacimiento	Alelo 1	Alelo 2	Haplogrupo	Clasificación	AIM nativo	AIM euro	AIM afro
T01	Tacuarembó	T	T	C	IA + AE	0,064	0,909	0,027
T02	Tacuarembó	T	T	C	IA + AE	0,041	0,928	0,031
T03	Tacuarembó	T	T	C1d	IA + AE	0,173	0,738	0,089
T10	Tacuarembó	T	T	D1g	IA + AE	0,031	0,922	0,047
T23	Tacuarembó	T	C	C1b	IA + AE	0,153	0,817	0,03

T24	Tacuarembó	T	C	B	IA + AE	0,08	0,873	0,047
T26	Tacuarembó	T	C	L3f1b	E + AS	0,392	0,583	0,025
T27	Tacuarembó	T	T	J1c	E + AS	0,092	0,865	0,043
T32	Tacuarembó	T	T	A2	IA + AE	0,047	0,799	0,154
T37	Tacuarembó	T	T	H	E + AS	0,116	0,78	0,104
T40	Tacuarembó	T	T	J	E + AS	0,083	0,683	0,234
T48	Tacuarembó	T	T	H2a	E + AS	0,097	0,833	0,07
T52	Tacuarembó	T	T	B	IA + AE	0,255	0,714	0,031
T54	Tacuarembó	T	C	T2e1a1b	E + AS	0,321	0,545	0,134
T56	Tacuarembó	T	T	H	E + AS	0,243	0,679	0,078
T57	Tacuarembó	T	T	H1e	E + AS	0,127	0,632	0,241
T58	Tacuarembó	T	T	D1j	IA + AE	0,123	0,834	0,043
T61	Tacuarembó	T	C	B	IA + AE	0,234	0,659	0,107
T66	Tacuarembó	T	C	B	IA + AE	0,189	0,764	0,047
T67	Tacuarembó	T	T	C	IA + AE	0,157	0,79	0,053
T68	Tacuarembó	T	T	H2	E + AS	0,131	0,646	0,223
T71	Tacuarembó	T	T	D	IA + AE	0,245	0,696	0,059
T76	Tacuarembó	T	T	C1	IA + AE	0,111	0,833	0,056
T77	Tacuarembó	T	T	L3e2b	E + AS	0,096	0,827	0,077
T81	Tacuarembó	T	T	T2b	E + AS	0,306	0,636	0,058
T83	Tacuarembó	T	C	C1	IA + AE	0,099	0,73	0,171
T98	Tacuarembó	T	T	B2	IA + AE	0,003	0,995	0,002
T158	Tacuarembó	T	T	U6	E + AS	0,03	0,839	0,131
T160	Tacuarembó	T	T	A2	IA + AE	0,451	0,395	0,154
T165	Tacuarembó	T	T	L1c2	E + AS	0,224	0,772	0,004

De la tabla 10, se obtuvieron las frecuencias alélicas para la variante por conteo directo, siendo para el alelo C, 0,12 y para el alelo T, 0,88.

5.2.1 Análisis de genotipo vs haplogrupo mitocondrial

Tabla 11. Frecuencias de haplogrupos mitocondriales para los genotipos de EDAR de la muestra de Tacuarembó.

	Haplogrupo IA + AE	Haplogrupo E + AS	Total
TT	12	11	23
CT	5	2	7
Total	17	13	30

Se utilizó la tabla 11 para realizar una prueba de χ^2 (gl=1; $\alpha=0,05$). El valor de χ^2 obtenido fue 0,22 y el p-valor = 0,639, por lo que no existe relación entre el genotipo y el haplogrupo mitocondrial.

5.2.2 Análisis de alelo vs haplogrupo mitocondrial

Tabla 12. Frecuencias de haplogrupos mitocondriales para los alelos de EDAR de la muestra de Tacuarembó.

	Haplogrupo IA + AE	Haplogrupo E + AS	Total
T	29	24	53
C	5	2	7
Total	34	26	60

Se utilizó la tabla 12 para realizar una prueba de χ^2 (gl=1; $\alpha=0,05$). El valor de χ^2 obtenido fue 0,19 y el p-valor = 0,6629, por lo que no existe relación entre los alelos y el haplogrupo mitocondrial.

Las frecuencias de los datos de las pruebas estadísticas realizadas anteriormente se resumen de forma gráfica en la figura 11.

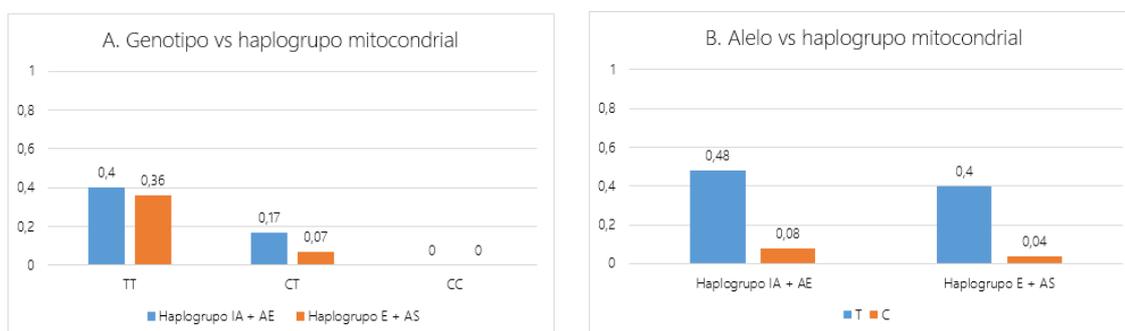


Figura 11. Visualización gráfica de los datos utilizados para las pruebas estadísticas de la muestra de Tacuarembó. A. Genotipo vs haplogrupo mitocondrial. B. Alelo vs haplogrupo mitocondrial

5.2.3 Análisis de alelo vs ancestría biparental

Se realizó el test de Wilcoxon para cada uno de los grupos de ancestría. La hipótesis nula para cada una de estas pruebas es que no existe diferencia significativa entre los diferentes genotipos y la ancestría biparental. En esta muestra no se encontraron individuos con genotipo CC.

Se utilizó la corrección de Bonferroni para cada una de estas pruebas, se utilizó el valor de $\alpha=0,016$

Tabla 12. Valores del Test de Wilcoxon y sus respectivos p – valores para cada una de las proporciones de ancestría testeadas contra el genotipo.

	W	p-valor
Europeo vs genotipo	55	0,2202
Africano vs genotipo	75	0,8062
Nativo vs genotipo	110	0,1584

Para cada una de las proporciones de ancestrías testeadas vs el genotipo la diferencia fue no significativa. Por lo que no existe diferencia entre los diferentes genotipos y la proporción de ancestría biparental.

Para cada uno de los conjuntos de valores (porcentajes de cada ancestría biparental) se halló las medias, medianas y desvío estándar (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de media, mediana y desvío estándar para cada ancestría respecto al genotipo.

		Media	Desvío estándar	Mediana
Europeo vs genotipo	TC	0,710	0,121	0,730
	TT	0,772	0,129	0,790
Africano vs genotipo	TC	0,0801	0,0572	0,047
	TT	0,0873	0,0703	0,059
Nativo vs genotipo	TC	0,210	0,115	0,189
	TT	0,141	0,106	0,116

Con los datos de la tabla 13, se realizó un gráfico de *boxplot* que representa gráficamente los datos para cada grupo con relación al genotipo correspondiente (Figura 12).

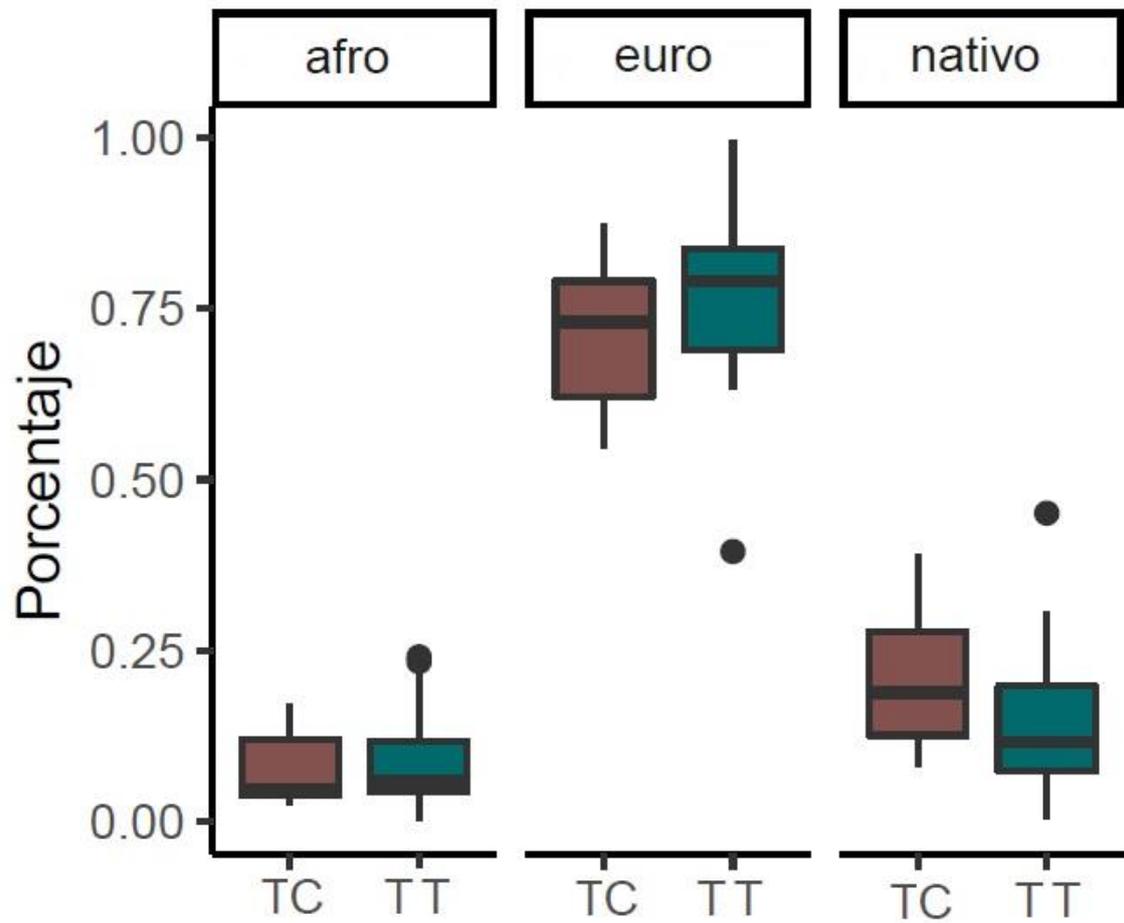


Figura 12. Gráfico de *boxplot* para los datos de cada una de las proporciones de ancestrías en referencia a los genotipos.

6. Discusión

Respecto a las hipótesis de trabajo planteadas, podemos dividir la discusión en tres secciones:

6.1 Relación entre fenotipo diente en pala y el alelo T1540C para la muestra de Montevideo.

Se utilizaron pruebas estadísticas entre los grupos con y sin el rasgo de diente en pala y el genotipo (TT, TC y CC) y los grupos con y sin el rasgo de diente en pala y los alelos (T, C). Se encontró que existen diferencias significativas en la relación del fenotipo con el genotipo y también entre la relación del fenotipo y los alelos. Además, para la relación entre fenotipo y alelo, el valor de riesgo relativo hallado indica que el portar este alelo incrementa en 3,36 veces la probabilidad de tener la característica dental mencionada. También el Test de Fisher realizado coincide en que ambas variables son dependientes. Estos datos son esperables, ya que diversos estudios muestran que la característica está asociada a esta mutación, por lo que la muestra analizada no difiere con otros trabajos realizados hasta el momento (Kimura et al. 2009; Park et al. 2012). Además, Kimura et al. (2009) indican que en un análisis de regresión el alelo 1540C aumenta 0,7 el grado del fenotipo diente en pala, mientras que el coeficiente de determinación fue 0,189, lo que significa que el 18,9% de la varianza es explicable por este polimorfismo de EDAR.

Por otra parte, hay que tener cuenta que el rasgo no es monogénico. No solo existen diferencias en su grado de expresión cuando se tiene en cuenta el carácter aditivo de los alelos (Hlusko et al. 2018) sino que también existen trabajos que evidencian la participación de otros genes en la formación/expresión del diente en pala (Kimura et al. 2015; Lee et al. 2012). Incluso en Kimura et al. (2009), se refieren a otro SNP de EDAR, C1487T, que participa en el proceso. Esta variante presentó un coeficiente de correlación menor que T1540C ($\rho = 0,36$ vs $\rho = 0,42$) en poblaciones japonesas, lo que sugiere que la aparente asociación esté dada por desequilibrio de ligamiento. La variante C1487T no aparece citada en otros trabajos, y por eso no fue incluida en este estudio.

Por estas razones es que EDAR T1540C no debería utilizarse únicamente como la variante determinante. Si bien, a nivel poblacional, las frecuencias de este alelo pueden dar idea de la presencia del rasgo, sobre todo en poblaciones donde el alelo C se ha fijado o se ha perdido, a nivel individual no es indicador del fenotipo y en las poblaciones mestizas es más difícil concluir sobre la frecuencia del alelo y la presencia del diente en pala. Esto último se discutirá más adelante.

6.2 Relación entre el gen EDAR y la variante T1540C como indicador de ancestría indígena.

En primer lugar, cabe aclarar que la decisión de realizar los análisis estadísticos para cada muestra de manera independiente está ligado a la metodología por la cual se obtuvieron los datos. Las muestras no fueron tomadas de igual manera y no se tenían los mismos datos para cada una de ellas. La muestra de Tacuarembó tenía datos de AIMs que se obtuvieron en estudios previos, pero no contaba con la información del fenotipo. Mientras que a la muestra de Montevideo no fue posible realizarle los estudios de ancestría biparental. Es por esta razón, que no se analizaron en conjunto.

Para Montevideo se estudió la relación entre el haplogrupo mitocondrial y primeramente, el fenotipo (individuos con y sin el rasgo de diente en pala), en segundo lugar el genotipo y en tercer lugar, los alelos. En el caso del fenotipo diente en pala, presente o ausente, vs origen del haplogrupo mitocondrial, la diferencia fue no significativa. Pero, cuando se testeó el origen del haplogrupo mitocondrial contra el genotipo y contra los alelos, la diferencia sí fue significativa, por lo que existe relación entre estas características.

Respecto al primer resultado (fenotipo vs haplotipo mitocondrial), es esperable ya que el diente en pala, como se mencionó anteriormente, se encuentra asociado a más de un gen y más de un SNP en el ADN nuclear. Por otra parte, el haplogrupo mitocondrial, se encuentra determinado por las mutaciones localizadas en el ADN mitocondrial y además, no comparten el mismo tipo de herencia, el ADN mitocondrial se transmite únicamente por vía materna. Es importante recalcar que, estos dos genomas no comparten localización en la célula e incluso tienen características que los diferencian de gran manera. Particularmente, el genoma nuclear está sujeto a recombinación, lo que permite mestizaje en los diferentes cromosomas, mientras que el ADN mitocondrial no sufre recombinación y los únicos cambios intergeneracionales se deben a nuevas mutaciones. Estas características, sumado al hecho que el proceso de mestizaje sucedió en una ventana temporal lo suficientemente amplia, puede estar influenciando para que el fenotipo y el genotipo se hayan desvinculado lo suficiente para no detectar relación. En un reciente trabajo, Kim et al. (2021) estudian la correlación entre rasgos fenotípicos y marcadores de ancestría, y determinan que la relación entre un fenotipo y la ancestría global de un individuo, puede perderse rápidamente y que incluso el desacoplamiento es mayor, cuando se tiene en cuenta pocos loci (lo que sería el caso del diente en pala). Y aún más, este proceso se acelera cuando el apareamiento es al azar.

Respecto al segundo resultado (genotipo/alelo vs haplotipo mitocondrial) si tenemos en cuenta las fuentes históricas y los recientes datos de Spangenberg et al. (2021) quienes establecen que el primer contacto entre europeos e indígenas en el Uruguay sucedió hace 11 generaciones (aproximadamente en el año 1658) podemos suponer que aún no pasó el tiempo suficiente para que se encuentren totalmente desvinculados, aunque está claro que

esta relación se ira modificando cuanto más tiempo pase y cuantos más eventos de mestizaje se produzcan en las poblaciones.

En el estudio de la muestra de Tacuarembó, también se realizaron análisis estadísticos entre los genotipos TT y TC (en esta muestra no se encontraron homocigotas para el alelo C) y el origen del haplogrupo mitocondrial, hallándose una diferencia no significativa, contrariamente a lo determinado para Montevideo. Por las mismas razones aludidas al referirnos a la falta de relación entre el origen de los haplogrupos mitocondriales y la presencia o ausencia del alelo T1540C en la población de Montevideo, podemos inferir que las diferencias entre los genomas analizados permitan que no haya conexión entre la característica y el haplogrupo mitocondrial. Por otra parte, las diferencias con Montevideo en cuanto a la relación genotipo y haplogrupo mitocondrial podrían deberse al tamaño de la muestra (N = 100 en Montevideo y N = 30 en Tacuarembó) y a la ausencia del genotipo CC.

Respecto al análisis entre genotipos y la proporción de ancestría biparental, se determinó que la diferencia no es significativa. Si bien no se analizaron datos de ancestría biparental en la muestra de Montevideo, podemos utilizar datos recientes publicados en Sans et al. (2021), donde se determinó que, tanto para muestras de Montevideo como para las muestras del norte del país, los valores medios de componentes individuales de ancestría coinciden en tener proporciones distintivamente superiores de origen europeo, y en menor medida indígenas y africanos. Para herencia biparental, en el trabajo de Sans et al. (2021) se obtuvieron los siguientes valores: para mujeres residentes en Montevideo, los valores promedio fueron 76,8% de aporte europeo, 13,8% de aporte indígena y 9,4% de aporte africano. Tomando como referencia el trabajo de Negro (2019) que utiliza los mismos datos de AIMs que este estudio, los valores de ancestría biparental para la muestra de Tacuarembó son: 80,4% europeo, 12,7% indígena y 6,9 africana. Podemos destacar la similitud de los datos entre las poblaciones de y Montevideo, teniendo ambas como mayor aporte en la ancestría global, el aporte europeo. Por lo que es esperable que portar el alelo C no tenga una relación con la ancestría indígena. Como fue mencionado anteriormente, el fenotipo diente en pala no se encuentra determinado exclusivamente por la variante 1540C, por lo que esta característica estaría influyendo en la no relación entre las variables testeadas.

No se puede obviar la referencia a los conocimientos sobre el proceso poblacional de nuestro país para estudiar los datos obtenidos. Existen claras diferencias entre los datos de ancestría dependiendo de los datos obtenidos de los diferentes marcadores moleculares (Bonilla et al. (2004); Gascue et al. (2005); Sans et al. (2021)). Esto se debe a las uniones direccionales entre mujeres indígenas y hombres europeos, y también es debido a otros procesos como por ejemplo, el genocidio sucedido en Salsipuedes (año 1831) donde la mayoría de los hombres indígenas de la etnia charrúa fueron asesinados (Sans, 2009; Acosta y Lara, 1985).

6.3 Relación entre las frecuencias de T1540C para distintas poblaciones

Se realizaron pruebas estadísticas que compararon los datos obtenidos con los de otras poblaciones. Para la muestra de Montevideo, se comprobó que las frecuencias alélicas encontradas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que no podemos verificar que exista alguna de las fuerzas evolutivas actuando sobre este rasgo.

La verificación de si la muestra, analizando por separado los individuos con y sin diente en pala, está en equilibrio de Hardy-Weinberg, en principio no se justificaría pues las muestras no provienen de distintas poblaciones, y porque al seleccionarse por presencia o ausencia del fenotipo no serían muestras aleatorias. Sin embargo, puede revestir interés si se entiende que el diente en pala es un fenotipo de alta frecuencia en poblaciones en las que se postula que EDAR T1540C habría sido objeto de selección natural (Sabeti et al. 2007; Kimura et al. 2009; Park et al. 2012). Sin embargo, ambas submuestras tuvieron un resultado no significativo, estando por lo tanto en equilibrio. Puede plantearse que, si hubo un evento de selección, ha pasado el tiempo suficiente para que no se detecte en la población actual. A futuro deberían testearse más variantes asociadas en una muestra más grande para determinar el peso real de este gen sobre el fenotipo.

Respecto al análisis de las distancias genéticas con otras poblaciones, en el análisis de componentes principales, tanto la muestra de Montevideo como la muestra de Tacuarembó, se encuentran más próximas a las poblaciones de Colombia y Puerto Rico. Aunque debe señalarse que no se cuenta con datos para poblaciones de la región de la cuenca del Plata. Como patrón general, las poblaciones de origen europeo, africano y Asia del sur forman un agrupamiento, y las poblaciones indígenas y asiáticas del este forman otro agrupamiento, y las poblaciones mestizas forman otro grupo, intermedio entre los otros dos.

Las poblaciones de Puerto Rico y Colombia (Medellín) tienen grados de mestizaje similares a la nuestra, son poblaciones trihíbridas (europeo, indígena y africano) como la mayoría de las poblaciones sudamericanas, donde el componente mayor es el europeo (Bryc et al. 2010; Norris et al. 2020). Cabe destacar que Puerto Rico presenta valores de ancestría africanos más elevados que Uruguay: 21,2% (Via et al. 2011); 23,6% (Bryc et al. 2010).

Las frecuencias de la variante T1540C en las muestras de Uruguay no presentan valores extremos (cerca de 0 o 1), esto lo podemos asociar al grado de mestizaje y al proceso poblacional de las ciudades. Los apareamientos direccionados se pueden ver también en estas poblaciones (Uruguay, Colombia, Puerto Rico), con altas frecuencias de haplogrupos europeos en los cromosomas Y, pero mayor ancestría indígena en ADN mitocondrial en primer lugar y africano en segundo lugar (Bedoya et al. 2006; Bryc et al. 2010).

Lo que queda en evidencia es que el grupo de poblaciones formado por Colombia, Puerto Rico, Montevideo y Tacuarembó, quedan separadas claramente del resto de las poblaciones utilizadas para el análisis. En particular con las que tienen origen africano, europeo y Asia del sur, ya que estas poblaciones casi no presentan la variante 1540C, es más, varias de ellas tienen la variante T fijada (con frecuencia de 1). Y también con el grupo de poblaciones de Asia del este, esta vez por la razón inversa: la alta frecuencia de la variable C. Dentro del *cluster* de poblaciones de Asia del este se encuentran también la muestra de Totonacos (población indígena) y la muestra de peruanos de Lima, que también presenta grados de ancestría indígena, más alto que respecto a otras poblaciones de Sudamérica (Norris et al. 2020). Las dos poblaciones mexicanas incluidas en el estudio presentan un valor intermedio entre poblaciones mestizas y poblaciones asiáticas/indígenas, esto también es concordante con datos de otros estudios (Bryc et al. 2010; Norris et al. 2020).

En el AMOVA se obtuvieron resultados no concluyentes. Los valores de varianza se modifican mínimamente cuando las poblaciones de Montevideo (UYU) y Tacuarembó (TAC) se analizan como un grupo independiente. Por lo que este resultado puede deberse a que se está utilizando un solo locus para el análisis, a la variabilidad de la frecuencia de la variante estudiada y al carácter mestizado de nuestra población.

7. Conclusiones

Se logró cumplir tanto con los objetivos generales como con los objetivos particulares. Este es el primer trabajo que analiza la relación de T1540C con el diente en pala y ancestría en Uruguay.

Respecto a las hipótesis planteadas podemos resumir de la siguiente manera:

Se constató que las personas que portan el alelo C presentan con mayor frecuencia el fenotipo diente en pala que aquellos que no lo portan.

No se halló relación entre el alelo T1540C y la ancestría indígena individual.

Por último, la frecuencia del alelo EDAR T1540C en la población uruguaya es consistente con lo esperado para una población mestiza americana.

Se concuerda con los trabajos previos que asocian a la variante EDAR T1540C con la morfología diente en pala. Si bien no se encontró asociación entre el fenotipo diente en pala y la ancestría uniparental determinada por el ADN mitocondrial, si se encontró relación para el genotipo y la ancestría mitocondrial para la población de Montevideo. Para la población de Tacuarembó no se determinó asociación entre el genotipo y el haplogrupo mitocondrial y tampoco entre la variante 1540C y la proporción de ancestría indígena cuando se tomó en cuenta la herencia biparental. Se propone a futuro agregar otros SNP asociados con el rasgo, ampliar la muestra y también obtener más datos de ancestría a nivel nuclear para reanalizar la asociación del fenotipo.

Se ubicó a la población uruguaya utilizando a la distancia genética para la variante T1540C del gen EDAR respecto a otras poblaciones mundiales. Las frecuencias obtenidas nos indican similitud con otras poblaciones americanas modernas mestizas, mostrando más cercanía en primer lugar con Colombia y Puerto Rico y luego con las poblaciones mexicanas. Mientras que para el AMOVA, los resultados obtenidos no aportaron información sobre las poblaciones respecto a los grupos testeados.

En suma, todos los datos obtenidos son concordantes con los estudios previos en esta materia como así también con trabajos realizados en otras poblaciones. Este relevamiento permitió obtener información a nivel genotípico de un rasgo muy utilizado para caracterizar poblaciones y del que no se tenían datos hasta el momento en nuestra población. Estos datos pueden ser incorporados en un futuro en estudios de genoma completo, los cuales podrían determinar asociaciones con otros genes o marcadores de ancestría. Esto podría ser utilizado tanto para aportar a los trabajos de selección de la variante como para determinar tiempos en eventos de mestizaje.

8. Bibliografía

- Acosta y Lara, E. (1985). "Salsipuedes 1831: los lugares". *Revista Facultad de Humanidades y Ciencias (Montevideo), Serie Ciencias Antropológicas*, 1: 65-88.
- Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Andrews, R., Kubacka, I., Chinnery, P. et al. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA - *Nature Genetics*, 23(2), 147. <http://www.nature.com/doi/10.1038/13779>
- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Bentley, D. R., Chakravarti, A., Clark, A. G., Donnelly, P., Eichler, E. E., Flicek, P., Gabriel, S. B., Gibbs, R. A., Green, E. D., Hurles, M. E., Knoppers, B. M., Korbel, J. O., Lander, E. S., Lee, C., Lehrach, H., Schloss, J. A. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68-74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Bedoya, G., Montoya, P., García, J., Soto, I., Bourgeois, S., Carvajal, L., Labuda, D., Alvarez, V., Ospina, J., Hedrick, P. W., & Ruiz-Linares, A. (2006). Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(19), 7234-7239. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508716103>
- Bonilla, C., Bertoni, B., González, S., Cardoso, H., Brum-Zorrilla, N., & Sans, M. (2004). Substantial Native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *American Journal of Human Biology*, 16(3), 289-297. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20025>
- Brandon, M. C., Ruiz-pesini, E., Mishmar, D., Procaccio, V., Marie, T., Nguyen, K. C., Spolim, S., Patil, U., Baldi, P., & Douglas, C. (2015). *NIH Public Access*. 30(1), 1-6. <https://doi.org/10.1002/humu.20801>
- Brown, W. M. (1980). Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(6 I), 3605-3609. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.6.3605>

- Bryc, K., Velez, C., Karafet, T., Moreno-Estrada, A., Reynolds, A., Auton, A., Hammer, M., Bustamante, C. D., & Ostrer, H. (2010). Genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(SUPPL. 2), 8954–8961. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914618107>
- Cann, R., Stoneking, M. & Wilson, A. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325, 31–36. <https://doi.org/10.1038/325031a0>
- Denton, L. C. (2011). Shovel-Shaped Incisors and the Morphology of the Enamel- Dentin Junction: an Analysis of Human Upper Incisors in Three Dimensions. May 2011.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Figueiro G, Mut P, Sans M. (2021). Los estudios moleculares para análisis de orígenes poblacionales y ancestría. *Revista del Instituto de Estudios Genealógicos del Uruguay* 37:287-303.
- Flores S. (2019) Genes relacionados con la metabolización de medicamentos en pacientes hipertensos y población general, y su relación con el mestizaje poblacional en Tacuarembó. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas
- Fujimoto, A., Kimura, R., Ohashi, J., Omi, K., Yuliwulandari, R., Batubara, L., Mustofa, M. S., Samakkarn, U., Settheetham-ishida, W., Ishida, T., Morishita, Y., Furusawa, T., Nakazawa, M., Ohtsuka, R., & Tokunaga, K. (2008). A scan for genetic determinants of human hair morphology: EDAR is associated with Asian hair thickness. *Human Molecular Genetics*, 17(6), 835–843. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm355>
- Galanter, J. M., Fernandez-Lopez, J. C., Gignoux, C. R., Barnholtz-Sloan, J., Fernandez-Rozadilla, C., Via, M., Hidalgo-Miranda, A., Contreras, A. V., Figueroa, L. U., Raska, P., Jimenez-Sanchez, G., Zolezzi, I. S., Torres, M., Ponte, C. R., Ruiz, Y., Salas, A., Nguyen, E., Eng, C., Borjas, L., ... Carracedo, A. (2012). Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the americas. *PLoS Genetics*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002554>
- García-Martín, P, Hernández-Martín, A., & Torrelo, A. (2013). Displasias ectodérmicas: revisión clínica y molecular. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 104(6), 451–470. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2012.07.012>
- Gascue, C., Mimbacas, A., Sans, M., Gallino, J. P, Bertoni, B., Hidalgo, P, & Cardoso, H. (2005). Frequencies of the four major Amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay. *Human Biology*, 77(6), 873–878. <https://doi.org/10.1353/hub.2006.0015>

- Gower, J. C. (2015). Principal Coordinates Analysis. Wiley StatsRef: Statistics Reference Online, 1–7. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat05670.pub2>
- Guiglioni, M. A., Bessone, G. G., & Juárez, R. P. (2014). La morfología dental en contextos clínicos, antropológicos y forenses. *Revista Estomatológica Herediana*, 24(3), 194. <https://doi.org/10.20453/reh.2014.2095>
- Guzmán, P. (2018). Frecuencia De Rasgos No-Métricos Dentales Según Nivel Socio- Económico En Población De Santiago, Chile. M, 89.
- Hanihara, T. (2008). Morphological variation of major human populations based on nonmetric dental traits. *American Journal of Physical Anthropology*, 136(2), 169–182. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20792>
- Hlusko, L. J., Carlson, J. P., Chaplin, G., Elias, S. A., Hoffecker, J. F., Huffman, M., Jablonski, N. G., Monson, T. A., O'Rourke, D. H., Pilloud, M. A., & Richard Scott, G. (2018). Environmental selection during the last ice age on the mother-to-infant transmission of vitamin D and fatty acids through breast milk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), E4426–E4432. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711788115>
- Holderegger, R., Kamm, U., & Gugerli, F. (2006). Adaptive vs. neutral genetic diversity: Implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21(6), 797–807. <https://doi.org/10.1007/s10980-005-5245-9>
- Hrdlička, A. (1920). Ales hrdlicka. *American Journal of Physical Anthropology*, 111(4).
- Hünemeier, T., Everardo, P., Ballesteros, M., Sánchez-mejorada, G., & Canizales, S. (2013). Frecuencias de un alelo del gen EDAR en totonacos de la sierra norte de Puebla y mestizos de la ciudad de México. January, 453–464.
- Kemp, B. M., Malhi, R. S., McDonough, J., Bolnick, D. A., Eshleman, J. A., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Johnson, J. R., Lorenz, J. G., Dixon, E. J., Fifield, T. E., Heaton, T. H., Worl, R., & Smith, D. G. (2007). Genetic analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *American Journal of Physical Anthropology*, 132(4), 605–621. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20543>
- Kemp, B. M., & Schurr, T. G. (2010). Variation in the Americas (Issue 38).
- Kimura, R., Yamaguchi, T., Takeda, M., Kondo, O., Toma, T., Haneji, K., Hanihara, T., Matsukusa, H., Kawamura, S., Maki, K., Osawa, M., Ishida, H., & Oota, H. (2009). A Common Variation in EDAR Is a Genetic Determinant of Shovel-Shaped Incisors. *American Journal of Human Genetics*, 85(4), 528–535. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.09.006>
- Kimura, R., Watanabe, C., Kawaguchi, A., Kim, Y. Il, Park, S. B., Maki, K., Ishida, H., & Yamaguchi, T. (2015). Common polymorphisms in WNT10A affect tooth morphology as well as hair

- shape. *Human Molecular Genetics*, 24(9), 2673–2680. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv014>
- Lee, W. C., Yamaguchi, T., Watanabe, C., Kawaguchi, A., Takeda, M., Kim, Y. II, Haga, S., Tomoyasu, Y., Ishida, H., Maki, K., Park, S. B., & Kimura, R. (2012). Association of common PAX9 variants with permanent tooth size variation in non-syndromic East Asian populations. *Journal of Human Genetics*, 57(10), 654–659. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.90>
- Negro, G. (2019). Estudio de variantes alélicas asociadas a persistencia de lactasa, ancestría y consumo de lácteos en población adulta de Uruguay Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas.
- Norris, E. T., Rishishwar, L., Chande, A. T., Conley, A. B., Ye, K., Valderrama-Aguirre, A., & Jordan, I. K. (2020). Admixture-enabled selection for rapid adaptive evolution in the Americas. *Genome Biology*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-1946-2>
- Pardo-Seco, J., Martín-Torres, F., & Salas, A. (2014). Evaluating the accuracy of AIM panels at quantifying genome ancestry. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-543>
- Park, J. H., Yamaguchi, T., Watanabe, C., Kawaguchi, A., Haneji, K., Takeda, M., Kim, Y. II, Tomoyasu, Y., Watanabe, M., Oota, H., Hanihara, T., Ishida, H., Maki, K., Park, S. B., & Kimura, R. (2012). Effects of an Asian-specific nonsynonymous EDAR variant on multiple dental traits. *Journal of Human Genetics*, 57(8), 508–514. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.60>
- Perego, U. A., Angerhofer, N., Pala, M., Olivieri, A., Lancioni, H., Kashani, B. H., Carossa, V., Ekins, J. E., Gómez-Carballa, A., Huber, G., Zimmermann, B., Corach, D., Babudri, N., Panara, F., Myres, N. M., Parson, W., Semino, O., Salas, A., Woodward, S. R., ... Torroni, A. (2010). The initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. *Genome Research*, 20(9), 1174–1179. <https://doi.org/10.1101/gr.109231.110>
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Reynolds, J., Weir, B. S., Cockerham, C. C., Carolina, N., & Carolina, N. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105(3), 767–779, <https://doi.org/10.1093/genetics/105.3.767>.
- Sabeti, P. C., Varilly, P., Fry, B., Lohmueller, J., & Hostetter, E. (2007). Europe PMC Funders Group Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature*, 449(7164), 913–918. <https://doi.org/10.1038/nature06250>

- Sans, M. (1992). Genética e Historia: Hacia una Revisión de Nuestra Identidad como "País de Inmigrantes." Ediciones Del Quinto Centenario I: Estudios Antropológicos, 19–42.
- Sans, M., Salzano, F., Chakraborty, R. (1997). Historical Genetics in Uruguay : Estimates of Biological Origins and Their Problems. *Human Biology*, 69(2), 161–170.
- Sans, M., Merriwether, D. A., Hidalgo, P. C., Bentancor, N., Weimer, T. A., Franco, M. H. L. P., Alvarez, I., Kemp, B. M., & Salzano, F. M. (2006). Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms. *American Journal of Human Biology*, 18(4), 513–524. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20520>
- Sans, M., Figueiro, G., Ackermann, E., Barreto, I., Egaña, A., Berton, B., Poittevin-Gilmet, E., Maytia, D., & Hidalgo, P. C. (2011). Mitochondrial DNA in Basque descendants from the city of Trinidad, Uruguay: Uruguayan- or Basque-like population? *Human Biology*, 83(1), 55–70. <https://doi.org/10.3378/027.083.0104>
- Sans, M., Figueiro, G., Hidalgo, P. C. (2012). A New Mitochondrial C1 Lineage from the Prehistory of Uruguay: Population Genocide, Ethnocide, and Continuity. *Human Biology*, 84(3), 287–305. <http://www.jstor.org/stable/23265999>
- Sans, M., Mones, P., Figueiro, G., Barreto, I., Motti, J. M. B., Coble, M. D., Bravi, C. M., & Hidalgo, P. C. (2015). The mitochondrial DNA history of a former native American village in northern Uruguay. *American Journal of Human Biology*, 27(3), 407–416. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22667>
- Sans, M., Figueiro, G., Hughes, C. E., Lindo, J., Hidalgo, P. C., & Malhi, R. S. (2015). A south American prehistoric mitogenome: Context, continuity, and the origin of haplogroup C1d. *PLoS ONE*, 10(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141808>
- Sans, M., Figueiro, G., Bonilla, C., Bertoni, B., Cappetta, M., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Mut, P., & Hidalgo, P. C. (2021). Genetic ancestry and social stratification in monteideo, Uruguay. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 23(1), 1–19. <https://doi.org/10.24215/18536387E029>
- Sassi, C., Picapedra, A., Lima, L. N. C., Massa, F., Gargano, V., Júnior, L. F., & Júnior, E. D. (2013). Contribución de la antropología dental en la determinación de la identidad uruguaya. *Actas Odontológicas*, 10(1), 29–45.
- Spangenberg, L., Fariello, M. I., Arce, D., Illanes, G., Greif, G., Shin, Y., Yoo, S., Seo, J., Robello, C., Kim, C., Sans, M., & Naya, H. (2021). Indigenous ancestry and admixture in the Uruguayan population.
- Sudmant, P. H., Rausch, T., Gardner, E. J., Handsaker, R. E., Abyzov, A., Huddleston, J., Zhang, Y., Ye, K., Jun, G., Fritz, M. H. Y., Konkkel, M. K., Malhotra, A., Stütz, A. M., Shi, X., Casale, F. P., Chen, J., Hormozdiari, F., Dayama, G., Chen, K., ... Korb, J. O. (2015). An integrated map

- of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*, 526(7571), 75–81.
<https://doi.org/10.1038/nature15394>
- Sutter, R. C. (2005). The Prehistoric Peopling of South America As Inferred From Epigenetic Dental Traits. *Andean Past*, 7, 183–217.
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 103–123.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)
- Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D. G., Mulligan, C. J., Bravi, C. M., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Khusnutdinova, E. K., Fedorova, S. A., Golubenko, M. V., Stepanov, V. A., Gubina, M. A., Zhadanov, S. I., Ossipova, L. P., Damba, L., Voevoda, M. I., Dipierri, J. E., ... Malhi, R. S. (2007). Beringian standstill and spread of native American founders. *PLoS ONE*, 2(9), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000829>
- Torroni, A., Schurr, T. G., Yang, C. C., Szathmary, E. J. E., Williams, R. C., Schanfield, M. S., Troup, G. A., Knowler, W. C., Lawrence, D. N., Weiss, K. M., & Wallace, D. C. (1992). Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*, 130(1), 153–162.
<https://doi.org/10.1093/genetics/130.1.153>
- Torroni, A., Sukernik, R. I., Schurr, T. G., Starikovskaya, Y. B., Cabell, M. F., Crawford, M. H., Comuzzie, A. G., & Wallace, D. C. (1993). mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *American Journal of Human Genetics*, 53(3), 591–608.
- Turner, C. G. (1967). Dental Genetics and Microevolution in Prehistoric and Living Koniag Eskimo. *Journal of Dental Research*, 46(5), 911–917.
<https://doi.org/10.1177/00220345670460054901>
- Turner, Christy G. (1979). Dental anthropological indications of agriculture among the Jomon people of central Japan. X. Peopling of the Pacific. *American Journal of Physical Anthropology*, 51(4), 619–635. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330510413>
- Turner, C. G. (1989). Teeth and prehistory in Asia. *Scientific American*, 260(2), 88–97.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0289-88>
- Turner, C. G. (1991). Scoring procedures for key morphological traits of the permanent dentition : the Arizona State University Dental Anthropology System. *Advances in Dental Anthropology*, June.
- Via, M., Gignoux, C. R., Roth, L. A., Fejerman, L., Galanter, J., Choudhry, S., Toro-Labrador, G., Viera-Vera, J., Oleksyk, T. K., Beckman, K., Ziv, E., Risch, N., Burchard, E. G., & Martínez-Cruzado, J. C. (2011). History shaped the geographic distribution of genomic admixture

on the island of puerto rico. PLoS ONE, 6(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016513>

Wright, S. (1965). The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating Author (s): Sewall Wright Published by : Society for the Study of Evolution Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2406450>. Journal of Evolution, 19(3), 395–420.

9. Anexo

Test AMOVA

El AMOVA de la distribución de partida fue realizado sin tener en cuenta las poblaciones a testear: Montevideo (UYU) y Tacuarembó (TAC), obtuvo un resultado significativo.

Se realizaron además, otros cinco tests AMOVA diferentes, usando como grupos y poblaciones los detallados en la tabla 1. Las muestras de Montevideo y Tacuarembó fueron agregadas a cada uno de estos grupos todos los resultados fueron significativos, obteniéndose valores muy parecidos para la reasignación de ambas poblaciones en cada uno de los 5 grupos.

Los valores de porcentaje de variación de varianza en cada una de los AMOVA así como sus p-valores se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Valores de variación de varianza y p valores para los tests AMOVA realizados.

	Entre grupos	Entre poblaciones dentro grupos	Intragrupos	p valor
Distribución de partida	67,82	6,56	25,63	< 0,0001
África con UYU y TAC	66,98	6,61	26,41	< 0,0001
América con UYU y TAC	66,07	7,4	26,53	< 0,0001
Asia del Este con UYU y TAC	61,19	12,05	26,76	< 0,0001
Europa con UYU y TAC	66,95	6,59	26,46	< 0,0001
Asia del Sur con UYU y TAC	66,95	6,58	26,47	< 0,0001

Las diferencias entre los valores obtenidos son mínimas, por lo que no permite concluir sobre una configuración óptima para las poblaciones testeadas.