



Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana

Informe de Pasantía de Grado

*“Estructura y diferenciación genética en las
poblaciones de los departamentos
Tacuarembó y Salto empleando las inserciones
ALUA25, ACE, B65, D1, PV92”.*

2023

Autor: Prof. Horacio Solé Sanjurjo

Tutor: Dr. Pedro C. Hidalgo

Orientador de Pasantía: Dr. Pedro C. Hidalgo

Co-orientador: MSc. Yasser Vega

PDU Diversidad Genética Humana, CUT UDELAR, Cenur noreste

Agradecimientos:

A mis tutores Dr. Pedro C. Hidalgo y MSc. Yasser Vega por las enseñanzas, guías y orientaciones en la realización de este trabajo y en mi formación.

Agradezco también a la Dra. Mónica Sans por brindarme la oportunidad y la confianza para formar parte del equipo del PDU Diversidad Genética Humana, así como también su tiempo, disponibilidad y dedicación para con sus estudiantes.

A todo el equipo del PDU, particularmente a la Ing. Lorena Luna por todo el apoyo, paciencia y disposición para enseñarme y guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio y en este camino de la ciencia.

A la coordinadora de la LBH en el interior, Lic. Isabel Volz por acompañarnos y orientarnos en nuestra formación.

También agradezco a mi familia y amigos, que sin entender mucho que estaba haciendo o porque seguía estudiando siempre me dieron para adelante, siempre apoyando.

A mi compañera de viaje, de casa, de vida, la que me aguanta el mal humor, me acompaña incondicionalmente y festeja mis logros, muchas gracias Manu.

Índice:	
1	Resumen..... 5
2	Introducción 6
2.1	Tacuarembó y Salto 7
2.2	Población objetivo y genética de poblaciones..... 7
2.3	Trabajos realizados con base en inserciones ALU en Uruguay 8
2.4	Las Inserciones ALU..... 9
2.5	Distancias genéticas..... 11
3	Objetivos: 12
3.1	Objetivo General 12
3.2	Objetivos Específicos..... 12
3.3	Objetivos Académicos..... 12
4	Metodología..... 12
4.1	Muestreo y encuestas..... 12
4.2	Inserciones ALU analizadas 13
4.3	Técnicas de laboratorio y análisis de los resultados 13
4.3.1	Extracción de ADN..... 13
4.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 13
4.3.3	Corridas de electroforesis 13
4.3.4	Análisis estadísticos de los datos 14
5	Resultados..... 17
5.1	PCR y electroforesis 17
5.2	Frecuencias genotípicas 19
5.3	Frecuencias alélicas..... 19
5.4	Equilibrio Hardy Weinberg..... 20
5.5	Heterocigosidad observada y esperada..... 21
5.6	Efecto Wahlund..... 22
5.7	Estadísticos F (Fit, Fis, Fst)..... 23
5.8	Identidad genética y distancia estándar (Da) genética de Nei (1972) 23
5.9	Distancia de Reynolds (1983)..... 23
5.10	Dendrograma (UPGMA)..... 24
6	Discusión 26
7	Conclusiones: 30
8	Bibliografía: 31
9	Anexos:..... 36

Índice de tablas, figuras, imágenes y gráficos:

Tablas:

Tabla 1. Clasificación y ejemplos de distancias genéticas.....	11
Tabla 2. Posiciones cromosómicas de inserciones Alu de interés para el trabajo.....	13
Tabla 3. Frecuencias genotípicas para la población de Tacuarembó.....	19
Tabla 4. Frecuencias genotípicas para la población de Salto.....	19
Tabla 5. Frecuencias alélicas por población.....	20
Tabla 6. Equilibrio Hardy Weinberg.....	21
Tabla 7. Heterocigosidad esperada y observada.....	21
Tabla 8. Equilibrio Hardy Weinberg tomando a ambas poblaciones como una sola.	22
Tabla 9. Heterocigosidad esperada y observada si ambas poblaciones fuesen una.....	22
Tabla 10. Estadísticos F.....	23
Tabla 11. Distancia de Reynolds	24
Tabla 12. Matriz de distancia genética Nei (DA).....	25
Tabla 13. Poblaciones consideradas para realizar dendograma.....	26

Figuras:

Figura 1: Mapa Uruguay con departamentos de interés.....	7
Figura 2: Modelo general de inserción Alu.....	10
Figura 3: Dendrograma a partir de distancias genéticas de Nei a través de método UPGMA utilizando solamente las poblaciones uruguayas.....	25
Figura 4: Dendrograma a partir de distancias genéticas de Nei a través de método UPGMA utilizando poblaciones amerindias, europeas, africanas y latinoamericana.....	25

Imágenes:

Imagen 1-5: Electroforesis con gel de agarosa al 1.5% para inserciones ALU.....	17
---	----

Gráficos:

Gráfico 1: Grafico de las frecuencias alélicas por población.....	20
---	----

1 Resumen

La genética de poblaciones, es una disciplina que ha aportado valioso conocimiento para entender los orígenes y migraciones de nuestra especie, la ancestría y el mestizaje que existe en ella.

Enmarcado dentro de la genética de poblaciones el presente trabajo tiene como objetivo realizar un estudio genético que aporte conocimiento sobre la diferenciación y la estructura genética de poblaciones de Tacuarembó y Salto utilizando el análisis de las frecuencias de 5 inserciones ALU (A25, ACE, B65, D1, PV92).

Para ello se realizó un muestreo de las poblaciones, obteniendo material genético de las mismas mediante técnicas de extracción de ADN, que luego se analizaron a través de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con posterior electroforesis en gel de agarosa.

Una vez obtenidas y analizadas las frecuencias alélicas y genotípicas, se realizaron los cálculos a través de herramientas bioinformáticas para estudiar la variabilidad, estructuración y distancia genética.

En cuanto a las frecuencias alélicas y genotípicas se observó que las poblaciones presentan un mayor número de homocigotos para el genotipo D/D y que todas las inserciones Alu resultaron ser polimórficas a excepción de D1 en Tacuarembó que resultó monomórfica. Teniendo en cuenta estudios anteriores en donde la frecuencia de la delección (ausencia de inserción) para Tacuarembó fue alta, y sumando el tamaño muestral pequeño, así como también el azar, el resultado para D1 podría ser coherente.

En los datos obtenidos de las muestras analizadas de la población de Salto, también se observaron valores altos de homocigotos D/D pero mostró ser más variable en cuanto a las frecuencias alélicas y fenotípicas, resultando tener mayor número de genotipos I/I e I/D. Se pudo apreciar que entre las poblaciones hay un grado significativo de endogamia, medida por los estadísticos Fis y Fit y que en las mismas hay una pequeña estructuración interna, teniendo en cuenta el resultado del estadístico Fst. Además, para reafirmar dicho resultado se se tienen en cuenta los valores del equilibrio Hardy Weinberg, donde para la mayoría de las inserciones resultó en desequilibrio y que posiblemente se esté apreciando un efecto Wahlund apreciado por la baja de la heterocigosidad si se toma ambas poblaciones como una.

Las poblaciones mostraron tener una distancia genética pequeña, 0,011 calculada a través de distancia genética de Nei y 0,02352 a través de distancia genética de Reynolds.

En cuanto al agrupamiento se vio que Salto y Tacuarembó agruparon en un mismo cluster pero mostrándose separadas, ya que Salto resultó tener una menor distancia con Montevideo que con Tacuarembó.

Palabras claves: Genética de poblaciones, Genética humana, Inserciones Alu, Uruguay

2 Introducción

La genética de poblaciones es una disciplina que ha aportado un valioso conocimiento para entender los orígenes y migraciones de nuestra especie. La misma es una subdivisión de la rama de la biología llamada genética, se encarga de esclarecer el origen de la variabilidad genética (Herrera-Paz, 2013) entre seres vivos. Dicha variabilidad genética se entiende como la diversidad que existe en las frecuencias de las variantes genéticas entre individuos o incluso entre poblaciones (National Human Genome Research Institute, 2006). La misma puede ser estimada, obteniendo una medida de divergencia genética que pudiese existir entre especies o dentro de una misma especie. Teniendo en cuenta que la variabilidad genética puede verse afectada por diversas fuerzas evolutivas estas deben ser consideradas al momento de estimar la misma.

La población uruguaya, incluidas las de Tacuarembó y Salto, está conformada por aportes de tres grupos principales, europeos, amerindios y africanos (Sans, 2009), los cuales se han reportado en diversos proyectos de investigación en nuestro país a través del estudio de marcadores genéticos como ADN mitocondrial, cromosoma Y, polimorfismos sanguíneos, inserciones ALU. Por otra parte, junto con estudios de mestizaje y ancestralidad se ha caracterizado a la población, estimando la distancia genética entre poblaciones provenientes del sur y norte de nuestro país. Esta última región mencionada del país se está estudiando desde el punto de vista antropogenético por diversas razones, entre ellas el hecho de que al igual que el resto del territorio nacional fue poblado por grupos amerindios conocidos como charrúas, guenoa minuanes y guaraníes (Bracco, 2004) y por otra parte por las diferencias entre los resultados en cuanto a ancestría y mestizajes encontrados con el sur de dicho territorio.

Grupos amerindios ya se encontraban en la región antes de las diversas migraciones de los grupos europeos hacia el territorio. Los grupos mencionados por Sans (2009) eran tres o cuatro, siendo el de mayor tamaño la macroetnia charrúa. Lamentablemente, luego de las campañas de exterminio que se llevaron a cabo desde 1801 a 1831, como la conocida “Salipuedes” y más tarde la del Mataojo, sumado la asimilación de guaraníes en la iglesia católica (Arocena, 2013), terminan por disolver a las poblaciones amerindias en el territorio (Cabrera y Barreto, 2005).

En relación con los grupos étnicos, europeos y africanos, su historia está relacionada. En Sans (2009) se menciona que con el inicio de las colonias arribaron al país tanto portugueses como españoles y con ellos afrodescendientes. En cuanto a esta población afrodescendiente el mayor flujo, así como el registro más antiguo, comienza en 1743 y para 1778 en Montevideo se registraban “9.298 habitantes: 6.695 españoles, 1.386 negros esclavos, 562 negros libres, 538 pardos libres y 117 indios, es decir, que 26,7% de los habitantes de la capital eran negros o mulatos y sólo el 1%, indígenas” (Sans, 2009).

Las oleadas de inmigrantes europeos se hicieron continuas a partir de la independencia del país y dicho aumento de la población europea coincide además con una disminución de afrodescendientes (Sans, 2009).

2.1 Tacuarembó y Salto

El 16 de junio de 1837 se promulga la ley n° 158 que le da creación a los departamentos de Tacuarembó y Salto, la cual dice:” Establécese que el territorio que hoy comprende Paysandú se dividirá en tres Departamentos con la denominación de Tacuarembó, Salto y Paysandú” (Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales, sf). Dichas actuaciones legales comparten el objetivo de legalizar las tierras y límites, así como también la propiedad privada.

Los departamentos de Tacuarembó y Salto (Fig. 1) son limítrofes, ubicados al norte del Río Negro, teniendo una cercanía apropiada que permite el flujo de poblaciones entre ambos.

En cuanto a superficie, el departamento de Salto ocupa 14.163 km² y Tacuarembó 15.438 km² (Observatorio Territorio Uruguay – OPP, sf)

Según el Instituto Nacional de estadística (2011) la población del departamento de Tacuarembó es de 90.051 habitantes y la del departamento de Salto es de 124.861 habitantes.



Fig. 1: Mapa Uruguay con departamentos de interés.

Ambos departamentos recibieron población inmigrante proveniente de Europa, África e incluso de países limítrofes como lo son Argentina y Brasil. Registros de dichas oleadas migratorias son los censos de 1908 y 1963 en donde se registraron inmigraciones de cuatro países, Italia, España, Argentina y Brasil (Pi Hugarte y Vidart, 1969). De dichos censos se extrae que para Tacuarembó en 1908 había menos del 1% de la población proveniente de Italia y España, y que individuos provenientes de Argentina y Brasil rondaban el 1 al 5% y el 5 al 10% respectivamente. En el censo de 1963 Tacuarembó mantiene los valores mencionados para la población proveniente de Italia y España, y disminuyen las poblaciones de argentinos y brasileños a menos del 1% para los primeros y del 1 al 5% los segundos.

Salto por su parte en 1908 registró que 1 al 5% de la población eran inmigrantes italianos y españoles, y de argentinos y brasileños el porcentaje se presentó en el rango del 10 al 15%. Para el censo de 1963 la población proveniente de España disminuye a menos del 1%, de Argentina y Brasil disminuye al rango de 1 al 5%, y por su parte la población de italianos se mantiene.

2.2 Población objetivo y genética de poblaciones

Se eligió como población objetivo a la de Tacuarembó y Salto por el hecho de que en la región se han realizado diversos estudios en genética poblacional. Dichos estudios aportaron conocimiento en cuanto a la diversidad de la población tomando en cuenta diversos marcadores y sistemas diversos, tales como inserciones ALU, sistema ABO, ADN mitocondrial y cromosoma Y.

En Tacuarembó se han reportado aportes amerindios y africanos más altos, en comparación con otras regiones estudiadas del territorio (Sans, 2009) evidenciándose en numerosas investigaciones que estudiaron diversos marcadores de ancestralidad.

En 1997 Sans et al., publican un trabajo con base en polimorfismos sanguíneos en donde realizan un estudio comparativo para la región de Montevideo y Tacuarembó, obteniendo que si bien en ambas ciudades el aporte europeo es predominante en Tacuarembó se registran aportes africanos de 15% e indígenas del 20%, siendo mayores estos aportes que en la capital del país. Más tarde utilizando marcadores para ADN mitocondrial se vuelve a obtener un porcentaje alto de aporte indígena (Sans, 2009).

En 2004, Bonilla et al., publican los resultados de una investigación realizada en la ciudad de Tacuarembó con el objetivo de analizar el mestizaje de la región a través de marcadores de ADNmt. El resultado fue sorprendente ya que el aporte amerindio alcanza un 62% e identificaron los cuatro haplogrupos fundadores nativos siendo los más frecuentes B y C.

Por otra parte, Bertoni et al., (2005) analizando 4 marcadores (microsatélites y loci bialélicos) del cromosoma Y en una muestra de varones de la ciudad de Tacuarembó obtienen resultados de aporte indígena en rango de 1,60% a 8,31%.

Para el 2019 se complementan los datos mencionados de ancestría por línea paterna, utilizando marcadores para el cromosoma Y. Mut (2019) revela que se encuentra muy poca evidencia de aportes indígenas y africanos por líneas paternas (por debajo del 1%), por lo que se podría pensar en un sesgo de flujo genético en favor de hombres europeos unidos a mujeres indígenas y africanas.

En cuanto a Salto, en el Laboratorio de Genética Molecular Humana del CENUR Litoral Norte de la UdelaR se investiga en el área de farmacogenética y la genética de anemias. En 2021 Soler en su tesis de doctorado incluye un apartado sobre ancestralidad en la población uruguaya a partir de 45 marcadores informativos de ancestría (AIMs) autosómicos. La muestra estudiada incluye a individuos de todo el país en tratamiento por leucemia linfoblástica aguda, entre los cuales 8 son del departamento de Tacuarembó y 10 de Salto. En esta investigación se encontró un 69,4% de aporte europeo, 19,7% amerindio y 10,9% africano. Cabe mencionar que la población fue analizada como una sola sin discriminar origen geográfico (departamental).

2.3 Trabajos realizados con base en inserciones ALU en Uruguay

Ciertas inserciones ALU ya han sido analizados o estudiado previamente en poblaciones de nuestro país, ellos son A25, ACE, APOA1, B65, D1, F13B, PV92 y TPA25.

Como primer antecedente tenemos el trabajo realizado por Hidalgo et al., (2014) en donde se estudiaron 10 inserciones ALU para estimar ancestralidad en poblaciones pertenecientes a Uruguay. En el mencionado trabajo se estudiaron tres poblaciones: Montevideo, descendientes de vascos de Montevideo y descendientes de vascos de Trinidad.

Se estimó el porcentaje de mestizaje obteniendo que el mayor porcentaje de aporte genético proviene de Europa (78-88%) seguida por aporte africano (10-15%) y de amerindios (0-10%).

Además, se evaluaron las distancias genéticas entre poblaciones llegando a una agrupación conformada por los vascos de Trinidad con europeos y por otro lado una agrupación conformada por las muestras obtenidas de Montevideo, descendientes vascos y no descendientes. En cuanto a esto último, la población de Montevideo, es interesante ya que refleja las condiciones de homogeneidad de la capital de nuestro país, incluso cuando se analiza una muestra de descendientes de una población específica como lo es la vasca.

Para el departamento de Tacuarembó se tomará como antecedente el trabajo de Vega et al., (2020). El mismo estimó a partir de 8 inserciones ALU la diversidad genética en la población mencionada. También se realizó un estudio comparativo entre poblaciones de Tacuarembó y Montevideo tomando en cuenta estudios previos hechos en las regiones en cuanto a ancestralidad y mestizaje, logrando comparar resultados de marcadores clásicos y marcadores ALU. El trabajo encuentra algunas diferencias en los aportes genéticos, por ejemplo, en lo que refiere al aporte genético nativo americano los marcadores ALU determinan un 7% en contraste con marcadores clásicos utilizados en estudios previos que mostraban un 20%. Por otra parte, para el aporte africano también se identificaron diferencias, pero a la inversa del caso anterior, ya que se obtiene un mayor aporte a través de inserciones ALU llegando a un 30% en comparación del 15% por marcadores clásicos. En el análisis del aporte europeo no se encuentran diferencias significativas.

Resulta interesante que, en este estudio, no se aprecia una diferencia en la distancia genética significativa entre las poblaciones de Tacuarembó y Montevideo, aunque los autores encontraron diferencias significativas entre la muestra analizada de Tacuarembó y los datos previamente obtenidos (Hidalgo et al., 2014) de vascos de Trinidad.

2.4 Las Inserciones ALU

De manera general, las inserciones ALU son parte de los llamados elementos móviles del ADN, un subgrupo de elementos repetitivos intercalados, siendo los más abundantes, representando el 10% de los mismos. Las inserciones, de una longitud de aproximadamente 300pb, constituyen por su presencia o ausencia marcadores bialélicos. (Díaz-Rousseau et.al., 2018).

Las inserciones ALU raramente se repiten en el mismo lugar de manera independiente (Batzner et al., 1994) y comúnmente se pueden encontrar en intrones, regiones no traducidas y en regiones genómicas intergénicas.

Estructuralmente, como se mencionó tienen una longitud de 300 pb, que se dividen en dos unidades o brazos de longitud similar (Weiner et al., 1986). En Häslar y Strub, (2006) se comenta que dichas unidades contienen sitios funcionales diferentes, el brazo derecho contiene una secuencia distintiva de 31pb que el brazo izquierdo no presenta, y este último

contiene un sitio promotor para la RNA polimerasa III tipo 2, en dos regiones denominadas Caja A y Caja B (Fig.2).

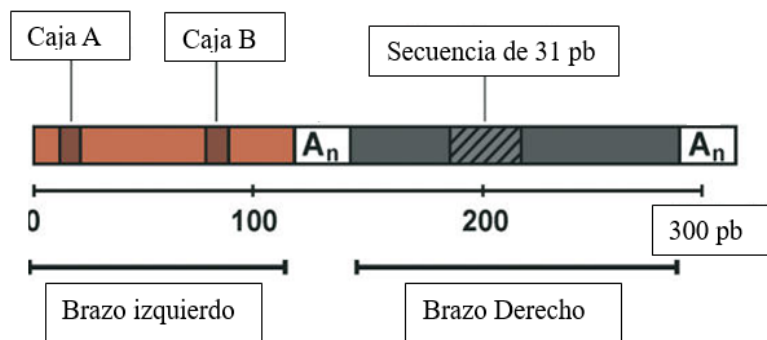


Figura 2: Modelo general de inserción ALU. Modificado de: Häsler y Strub, (2006)

Las inserciones ALU se han propagado durante 65 millones de años generando más de 1 millón de copias en el genoma de los primates (Batzer y Deininger, 2002).

Dichas inserciones pueden afectar al genoma de diversas maneras, tales como:

- Generar mutaciones por inserción
- Recombinación de inserciones homologas
- Conservación de genes
- Alteración en la expresión de genes

Las inserciones ALU aumentan en cantidad gracias a un proceso denominado retrotransposición, en donde se genera una o más copias de ADN a partir de un transcrito de ARNm del gen, el cual se vuelve a insertar en el genoma.

Menciona Gomez et al., (2007) que son interesantes desde el punto de vista antropogenético porque se los relaciona con el origen y expansión de los primates. Además, diversos autores (Gómez et al., 2007; Di Santo, 2018; Resano, 2018) coinciden en que estos polimorfismos son de mucha utilidad para brindar información comparativa de poblaciones distantes geográficamente ya que se conocen sus estados ancestrales. Dicho estado ancestral para inserciones ALU es la ausencia de la misma (Batzer y Deininger, 2002) en una ubicación genómica que generalmente se encuentra cerca de un gen. Es por dichas ubicaciones genómicas que han sido de interés para el estudio de ciertas enfermedades, como por ejemplo enfermedades de índole cardiovascular en donde la inserción ALU ACE es un factor de riesgo (Sayed-Tabatabaei, 2006).

2.5 Distancias genéticas

El concepto de distancia genética hace referencia a la medida de divergencia genética que pudiese existir entre especies o dentro de una misma especie.

Mientras más pequeñas sean las distancias genéticas más vinculadas están las poblaciones, y entre mayores sean las distancias menos vinculadas estarán. Es decir que si la distancia genética entre poblaciones es pequeña las mismas comparten variantes genéticas y un ancestro en común reciente.

Para poder estimar las distancias genéticas se aplican una serie de estadísticos y formulas en concordancia con modelos evolutivos y matemáticos.

Según Demarchi (2009) las llamadas distancias genéticas de una población pueden ser divididas en dos grupos dependiendo de ciertas características. El primer grupo que son las llamadas “distancias genéticas geométricas” y un segundo grupo, las “distancias genéticas que siguen un modelo evolutivo” (Tabla.1).

Tabla 1: Clasificación y ejemplos de distancias genéticas.

Distancias genéticas geométricas	Distancias genéticas que siguen un modelo evolutivo
Relacionan directamente a las frecuencias alélicas con las similitudes entre poblaciones sin tomar en cuenta aquellos factores relacionados con la evolución (Demarchi, 2009).	Se atribuye la variación a acciones de factores que influyen en la evolución, tales como, la mutación y la deriva génica, pero además se asume que los marcadores no están sujetos a la selección natural. Otra cualidad de este grupo, es que se ajustan a un modelo llamado “Infinite Alleles Model o IAM” según el cual cada mutación genera un alelo nuevo (Demarchi, 2009).
Distancias genéticas geométricas más utilizadas en genética de poblaciones:	Distancias genéticas que siguen un modelo evolutivo más utilizadas en genética de poblaciones:
• Distancia cuerda (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967) • Distancia de Rogers (Rogers, 1972) • Distancia de Nei (DA) (Nei et al., 1983)	• Distancia estándar (Da) de Nei (1972) • Co-ancestralidad de Reynolds (Reynolds et al., 1983).

3 Objetivos:

3.1 Objetivo General

- Contribuir al conocimiento sobre la diferencia, distancia y estructuración genética en la población uruguaya, particularmente de Tacuarembó y Salto.

3.2 Objetivos Específicos

- Estimar en Salto y Tacuarembó las frecuencias alélicas y genotípicas de cinco inserciones ALU.
- Investigar si en las poblaciones pudiesen estar actuando fuerzas evolutivas aplicando cálculos de equilibrio Hardy-Weinberg.
- Analizar la endogamia y la diferenciación entre las poblaciones aplicando estadísticos F.
- Analizar, a través de distancias genéticas, las vinculaciones entre Salto y Tacuarembó, y de estas con otras poblaciones uruguayas y del resto del mundo.

3.3 Objetivos Académicos

- Familiarización y acercamiento al trabajo científico y su divulgación.
- Aprendizaje y ejecución de técnicas de laboratorio orientadas a la genética.
- Intercambio académico con científicos del área.
- Aprendizaje sobre la elaboración de bases de datos para el análisis de resultados.

4 Metodología

4.1 Muestreo y encuestas

El muestreo se realizó según las características solicitadas en el proyecto de investigación actual del PDU de Diversidad Genética Humana del CENUR noreste, sede Tacuarembó a cargo de la Dra. Mónica Sans y el Dr. Pedro C. Hidalgo. Dichas características se refieren a que la muestra debe de ser de adultos mayores de 30 años, de ambos sexos, sin vínculos consanguíneos y nacidos en los departamentos de interés o que estén establecidos en los mismos por lo menos en un periodo de dos elecciones municipales.

Se obtuvieron 52 muestras de saliva de individuos pertenecientes al departamento de Tacuarembó de las cuales 48 fueron muestreados para el presente proyecto y 4 muestras fueron obtenidas de la base de datos del laboratorio pertenecientes a otros proyectos. Para la población de Salto se obtuvieron 53 muestras de ADN en colaboración con el laboratorio de genética molecular humana del CENUR Litoral Norte de la UdelaR sede Salto.

Todas las personas muestreadas fueron encuestadas a través de un cuestionario (anexo I) con el fin de obtener información relevante para el proyecto (anexo I).

Junto con la encuesta se obtuvo un consentimiento informado por el cual los participantes se pusieron en conocimiento del objetivo del proyecto y además se aseguró la confidencialidad

de los datos obtenidos a través de él. Los aspectos éticos del proyecto están avalados por el Comité de ética de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación con el número de expediente 121900-000162-20.

4.2 Inserciones ALU analizadas

En el presente trabajo se analizarán las inserciones A25, ACE, B65, D1 y PV92 las cuales tienen un marco de referencia bibliográfica y experimental amplio mostrando ser buenas opciones para el estudio desarrollado aquí.

Tabla 2: Posiciones cromosómicas de inserciones ALU de interés para el presente trabajo

Inserción	Posición cromosómica	Fuente
A25	8q21.3	Gómez-Pérez et al., (2007)
ACE	17q23	Gómez-Pérez et al., (2007)
B65	11q14.2	Gómez-Pérez et al., (2007)
D1	3q26.32	Gómez-Pérez et al., (2007)
PV92	16q24.2	Gómez-Pérez et al., (2007)

4.3 Técnicas de laboratorio y análisis de los resultados

4.3.1 Extracción de ADN

Luego de obtenidas las muestras de saliva se procedió con la extracción de ADN siguiendo el protocolo de extracción de saliva estandarizado (Miller et al.,1988) y modificado por el Dr. B. Bertoni. El mencionado protocolo se encuentra en el anexo II.

4.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar la PCR previamente se seleccionaron los *primers* adecuados para las inserciones ALU, los cuales se visualizan en el anexo III. Las amplificaciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron siguiendo los protocolos que se observan en anexo IV.

4.3.3 Corridas de electroforesis

Los productos de PCR se analizaron por medio de corridas de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con tinción de bromuro de etidio. Los mismos fueron corridos en una cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa por 40 minutos a 1 hora a 100 V con buffer TBE

(Tris-Borato-EDTA) al 1x.

Para estimar los tamaños de los fragmentos obtenidos en la PCR la electroforesis se corrió con un marcador de peso molecular Thermo Fisher que contiene fragmentos de ADN de entre 50 y 1000 pares de bases.

4.3.4 Análisis estadísticos de los datos

Una vez obtenidos los resultados de la amplificación y determinado los genotipos de las inserciones ALU en cada muestra a través de los pesos moleculares de los fragmentos se generó una base de datos utilizando el programa GeneAlex V.6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

Posteriormente se estimaron frecuencias alélicas para cada inserción ALU en cada población. La frecuencia alélica mide la proporción relativa de cada alelo en una cierta población. Puede ser estimada contando la cantidad de veces que se observa el alelo de un locus y dividiendo entre el número total de alelos estudiados (Venugopal y Partibha, 2006). Luego se calcularon las frecuencias genotípicas dividiendo el número de casos observados de cada genotipo entre el total de muestras que se analizó. El resultado de ello se multiplica por 100% para obtener el porcentaje de las frecuencias genotípicas.

El equilibrio Hardy Weinberg se calculó para cada inserción ALU utilizando el programa GeneAlex V.6.5 (Peakall y Smouse, 2012). El equilibrio utiliza el supuesto de la hipótesis nula de que cualquier variación que genere una desviación en el equilibrio sería una evidencia de que hay fuerzas evolutivas, sistemáticas o aleatorias actuando. Dichas fuerzas son, mutaciones, flujo génico, selección, deriva génica y consanguinidad (Venugopal y Partibha, 2006). Esta ley se cumple en poblaciones que se encuentran estáticas.

Para el presente trabajo se consideraron que valores de significancia de $p < 0.05$ rechazan la hipótesis nula y en ese caso la población no se encuentra en equilibrio de HW para el locus analizado.

Se calculó heterocigocidad observada y esperada para cada marcador en cada población. Con ello se pudo obtener una comparación de la diferencia genética presentada en las poblaciones en estudio y ampliar el panorama de la relación de homocigotos y heterocigotos.

Se calcularon los estadísticos F (F_{it} , F_{is} , F_{st}), los cuales brindan un acercamiento a la estructuración genética de la población. Dichos parámetros, también denominados índices de fijación, fueron expuestos por Wright (1943, 1951) y modificados por diversos autores; en el presente trabajo se utilizaron los índices de fijación de Wright, según el método de Nei (1977). F_{is} es el coeficiente de endogamia local (intrapoblacional) y mide la probabilidad que existe de que dos alelos sean iguales por descendencia en un individuo que pertenece a una subpoblación que tiene una reproducción panmictica. La probabilidad de que dos alelos sean iguales por descendencia nos brinda una medida de la reducción de la heterocigocidad, dicho de otra manera, el aumento de homocigosis como resultado de apareamientos consanguíneos (Díaz-Rousseau et.al, 2018).

Para el F_{is} se pueden obtener valores entre menos uno (-1) y uno (+1), donde resultados negativos podría mostrar un exceso de heterocigotos y valores positivos, al contrario, un déficit de heterocigotos (Hedrick, 2005). El parámetro se calcula de la siguiente manera: $F_{is} = (media$

$H_e - \text{media } H_o) / \text{media } H_e$, en donde H_o y H_e son heterocigosidad observada y esperada respectivamente.

El siguiente parámetro es el F_{it} el cual es similar al anterior, pero con la salvedad de que se mide tomando al conjunto de subpoblaciones como una sola. Los valores de F_{it} oscilan en el mismo rango que el F_{is} y se analizan de igual manera.

El parámetro F_{it} se calcula de la siguiente manera: $F_{it} = (H_t - \text{media } H_o) / H_t$, donde H_t es heterocigosidad esperada en la población total.

Por último, se calculó el F_{st} que mide la reducción de la heterocigosidad para una subpoblación debido a cruzamientos no al azar y a la deriva génica respecto a la población total. Por tanto, este estadístico muestra si hay subdivisión interpoblacional midiendo la divergencia genética entre subpoblaciones (Demarchi, 2014). Sus valores se encuentran entre cero y uno, siendo cero la ausencia de diferenciación genética entre subpoblaciones y uno la fijación de alelos diferentes en cada subpoblación y por tanto diferenciación genética importante. El parámetro F_{st} se calcula de la siguiente manera: $F_{st} = (H_t - \text{media } H_e) / H_t$. Tanto el EHW como los estadísticos F fueron calculados a través del programa GeneAlex V.6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

Dados los resultados del EHW, las heterocigosidades y el F_{st} se evaluó un posible efecto Wahlund (1928), que sucede cuando una población se estructura en dos subpoblaciones o más que se diferencian en cuanto a frecuencias alélicas y genotípicas produciendo un aumento de homocigotos en ciertos locus específicos y una reducción de la heterocigosidad total. Según Díaz-Rousseau et.al (2018) se puede analizar este efecto utilizando a las muestras de las diferentes poblaciones como una sola y evaluando la heterocigosidad, la cual debería ser menor. Es por esto que se evaluó tanto para el equilibrio Hardy Weinberg como para heterocigosidad dicho efecto, utilizando ambas poblaciones como una sola.

Siguiendo con el análisis estadístico mediante el mismo programa mencionado se obtuvo la identidad genética y la distancia genética de Nei (1972). Primero se estableció la identidad genética, la misma establece la probabilidad de que dos alelos tomados al azar uno de cada población sean idénticos. Para la identidad genética de Nei se obtienen valores entre 0 y 1, donde 0 significa que las poblaciones son distintas y 1 son idénticas.

Luego de tener la identidad se puede calcular la distancia genética de Nei (1972) de la siguiente manera:

$$D_a = -1 \ln(J_{xy} / \sqrt{J_x J_y})$$

J_{xy} es la homocigosis media sobre los loci de la población x e y . La otra forma de expresar la fórmula de dicha distancia es: $-1 * \ln(\text{identidad de Nei})$.

Esta medición toma valores entre 0 e infinito. Demarchi (2009) menciona que se formuló teniendo en cuenta una serie de aspectos fundamentales, tales como que la tasa de mutación debe de ser constante, el tamaño de la población debe mantenerse igual y constante a través de las generaciones y que dichas poblaciones deben estar en equilibrio deriva-mutación.

Teniendo en cuenta el modelo de alelos infinitos (IAM), la distancia estándar de Nei se incrementa linealmente con el tiempo siempre que se cumpla con el equilibrio de mutación-deriva (Demarchi, 2009).

Se calculó luego la distancia de Reynolds, (1983) a través del paquete informático Arlequín (Excoffier et al., 1992) el cual utiliza el parámetro F_{ST} para medir la diferenciación genética.

La distancia de Reynolds, (1983) parte de que no existe mutación y que la única fuerza evolutiva actuante sobre la frecuencia alélica es la deriva génica. El hecho de un incremento de distancia genética es proporcional con el aumento de tamaño de la población y a diferencia de lo mencionado para Nei (1972), el tamaño poblacional no es constante (Demarchi, 2009). Por tanto, en este caso la distancia se enfoca en cambios en la frecuencia génica (Aranguren-Méndez et al., 2005)

La distancia de Reynolds et al., (1983) se calcula de la siguiente manera:

$$DL = -\ln (1 - F_{ST})$$

Se entiende por F_{ST} a “la correlación entre dos gametos tomados al azar, uno de cada una de las subpoblaciones”, en donde dicha correlación sirve para “medir el grado de diferenciación genética entre dos subpoblaciones” (Aranguren-Méndez et al., 2005, p.38).

Para profundizar en las relaciones genéticas entre las poblaciones se realizaron dendrogramas a partir de la distancia genética de Nei et al., (1983) utilizando el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973).

La distancia genética de Nei et al., (1983) se define como aquella probabilidad que existe de seleccionar un alelo al azar teniendo en cuenta dos poblaciones distintas y que el mismo sea idéntico, así como también seleccionar dos alelos al azar en una sola población y que estos sean idénticos.

Demarchi (2009) menciona que “siendo X_u = la frecuencia alélica del alelo u en la población X y Y_u = la frecuencia alélica del alelo u en la población Y ” (p.76), el cálculo es el siguiente:

$$D_A = 1 - \sum_u \sqrt{X_u Y_u}$$

Los resultados de la distancia de Nei et al., (1983) son expresados en valores de 0 y 1, cuando el resultado es de 1 las poblaciones no comparten alelos (Figueiro, 2006).

El método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) es un método de clasificación basado en el cálculo de la media de las distancias que existen entre la pareja más similar y con el resto de los individuos o poblaciones y de ese modo reconstruir un árbol. En el mismo se incluyeron las poblaciones de Tacuarembó y Salto y además poblaciones de otras regiones del continente y del mundo, así como también poblaciones de nuestro país. Para ello se utilizó el programa informático PHYLIP (Felsenstein, 2002) para generar la matriz de distancia y FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2019) para construir los dendrogramas. Las poblaciones consideradas se muestran en la tabla 15.

5 Resultados

5.1 PCR y electroforesis

La técnica PCR según los protocolos establecidos permitió obtener los genotipos correspondientes para cada inserción ALU (Anexo V).

Como forma de ejemplificar el trabajo realizado se añade a continuación una serie de imágenes en donde se observan geles de agarosa al 1,5%. Se realizó la electroforesis del producto de PCR de las diferentes inserciones ALU.

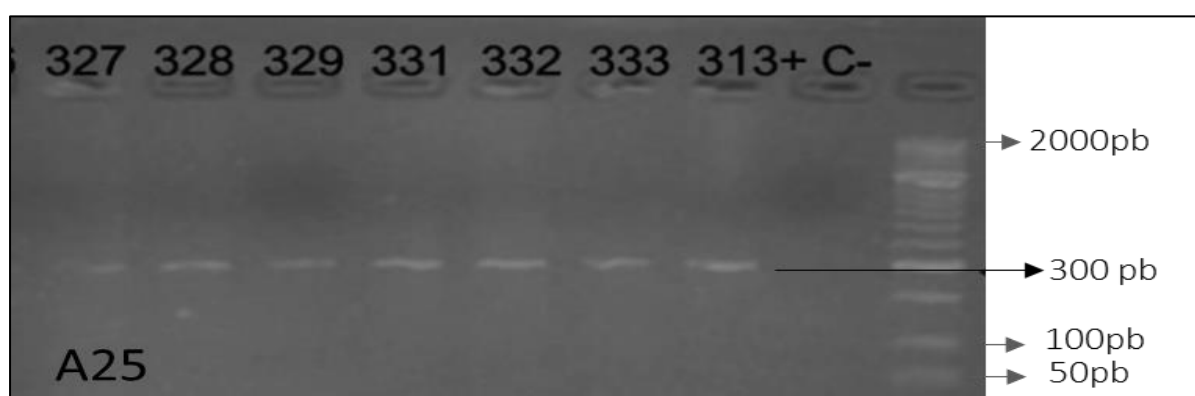


Imagen 1: Electroforesis con gel de agarosa al 1.5% para inserción ALU A25.

En la imagen 1 se puede visualizar la presencia de solamente bandas de 300 pb correspondiente a la delección. Para este marcador la inserción tiene un tamaño molecular de 670 pb. La muestra es perteneciente al departamento de Tacuarembó, además con la referencia 313+ un control positivo y C- un control negativo. Se utilizó en este caso un marcador de peso molecular de 50 pb. Se aprecia que todas las muestras presentan un genotipo D/D siendo homocigotos para la delección o ausencia de inserción.

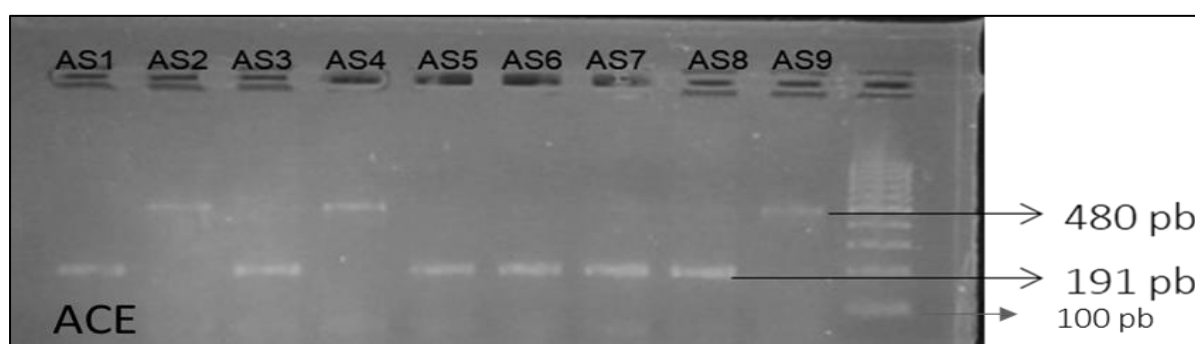


Imagen 2: Electroforesis con gel de agarosa al 1.5% para inserción ALU ACE.

En la imagen 2 se observan bandas correspondientes a la delección con un tamaño de 191 pb y a la inserción con un tamaño de 480 pb. Se utilizó en este caso un marcador de peso molecular de 100 pb. Las muestras pertenecen al departamento de Salto y como resultado se obtuvieron genotipos D/D y I/I, ambos homocigotos.

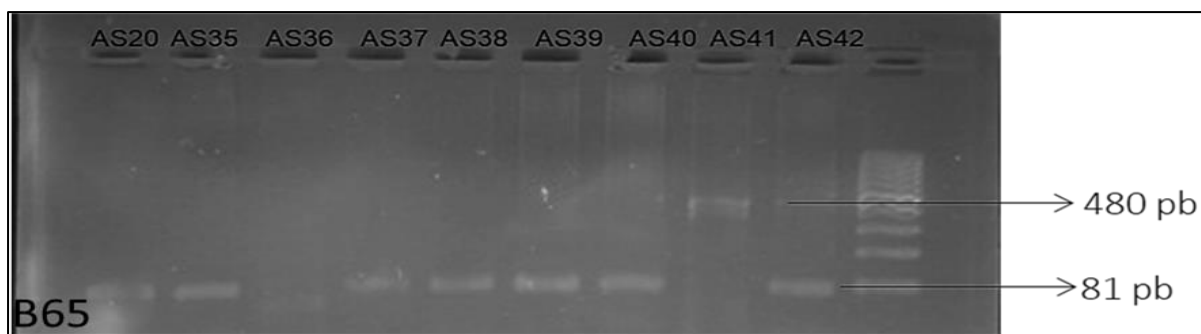


Imagen 3: Electroforesis con gel de agarosa al 1.5% para inserción ALU B65.

La imagen 3 corresponde a la visualización de fragmentos amplificados de la inserción B65 para muestras pertenecientes al departamento de Salto. Como se aprecia la inserción tiene un tamaño molecular de 480 pb y se observa solamente en el individuo AS41 el cual tiene un genotipo I/I. La delección tiene un tamaño de 81 pb. Se utilizó Ladder de 100 pb.

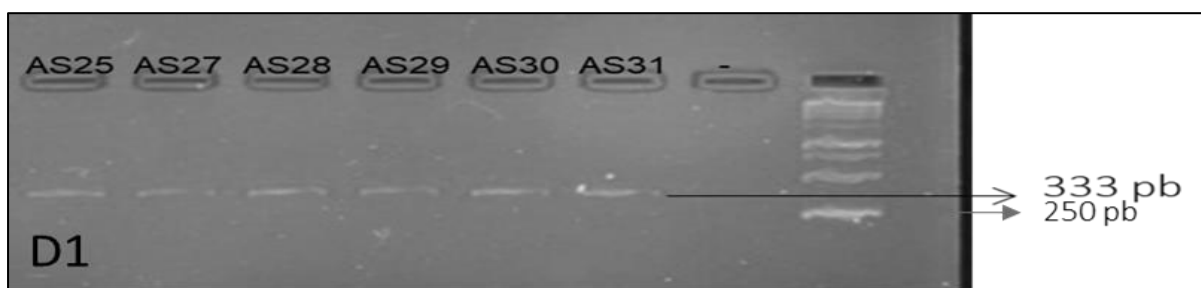


Imagen 4: Electroforesis con gel de agarosa al 1.5% para inserción ALU D1.

Por otra parte, en la imagen 4 se observa fragmentos amplificados correspondientes a la delección de la inserción Alu D1, con un tamaño de 333 pb. En la misma se observan genotipos D/D homocigotos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 250 pb. Con el símbolo – se indica el control negativo. Para este marcador la inserción tiene un tamaño molecular de 620 pb.

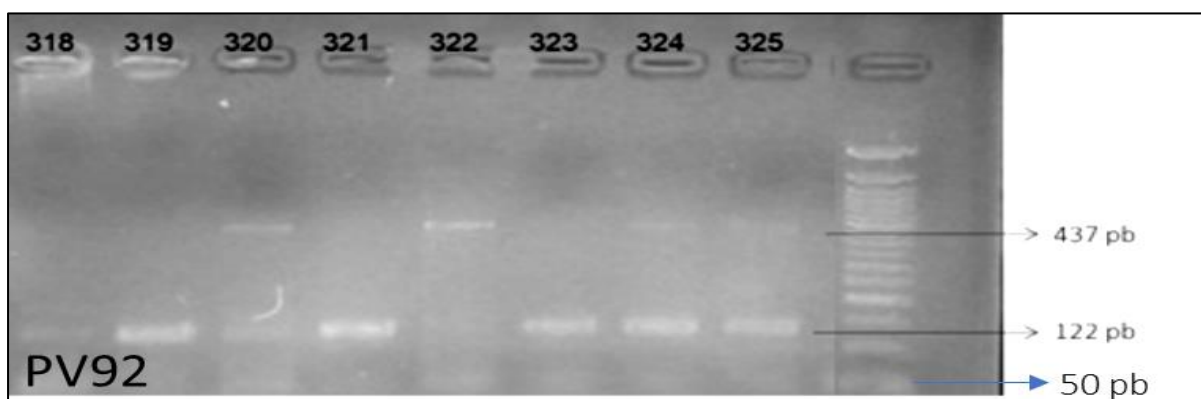


Imagen 5: Electroforesis con gel de agarosa al 1.5% para inserción ALU PV92.

Por último, en la imagen 5 se observa una electroforesis realizada para la inserción ALU PV92. En este caso la delección tiene un tamaño de 122 pb y la inserción de 437 pb. Como resultado

se obtuvieron genotipos I/D, D/D e I/I. Los individuos pertenecen al departamento de Tacuarembó.

5.2 Frecuencias genotípicas

Con base en los resultados anteriormente mencionados (anexo IV) se calculó a través de observación directa la frecuencia genotípica. Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3: Frecuencias genotípicas para la población de Tacuarembó

	N	Frecuencia genotípica (D/D)	Frecuencia genotípica (I/I)	Frecuencia genotípica (I/D)
A25	50	98%	2%	0%
ACE	50	74%	18%	8%
B65	47	79%	17%	4%
D1	48	100%	0%	0%
PV92	48	77%	2%	21%

Tabla 4: Frecuencias genotípicas para la población de Salto

	N	Frecuencia genotípica (D/D)	Frecuencia genotípica (I/I)	Frecuencia genotípica (I/D)
A25	52	75%	2%	23%
ACE	53	59%	26%	15%
B65	49	51%	20%	29%
D1	50	98%	2%	0%
PV92	48	85%	4%	11%

Como se aprecia en las dos poblaciones hay un predominio del genotipo D/D, con mayores porcentajes en la población de Tacuarembó.

Para el genotipo I/I la mayor y menor frecuencia en ambas poblaciones resultaron en ACE y D1 respectivamente. Para Tacuarembó ACE tiene una frecuencia de 18% y D1 de 0 %, por su parte Salto obtiene para ACE una frecuencia de 26% y para D1 2%.

En cuanto a genotipo I/D la mayor frecuencia para Tacuarembó resultó ser PV92 (21%) y para Salto B65 (29%). La menor frecuencia para dicho genotipo para ambas poblaciones la obtiene D1 con 0% en ambos casos. Cabe resaltar que en Tacuarembó A25 también obtuvo una frecuencia genotípica I/D de 0%.

5.3 Frecuencias alélicas

Como resultado se obtiene que todas las inserciones ALU resultaron polimórficos con excepción de D1 para Tacuarembó que resultó ser monomórfico. Para este último mencionado, al ser monomórfico obtiene la mayor frecuencia alélica (1,000) correspondiente a la delección.

En cuanto a las inserciones ALU con resultados polimórficos para la población de Tacuarembó el resultado con mayor frecuencia para la delección fue A25 (0,980) y para la población de Salto la mayor frecuencia para la delección la obtuvo D1 (0,980).

Para la inserción la mayor frecuencia de las muestras de Tacuarembó la obtuvo ACE (0,224), y para las muestras de Salto la mayor frecuencia de inserción corresponde a B65 (0,340).

Tabla 5: Frecuencias alélicas por población

Locus	Alelo	Tacuarembó	Salto
A25	Delección	0,980	0,865
	Inserción	0,020	0,135
ACE	Delección	0,776	0,679
	Inserción	0,224	0,321
B65	Delección	0,804	0,660
	inserción	0,196	0,340
D1	Delección	1,000	0,980
	Inserción	0,000	0,020
PV92	Delección	0,872	0,917
	Inserción	0,128	0,083

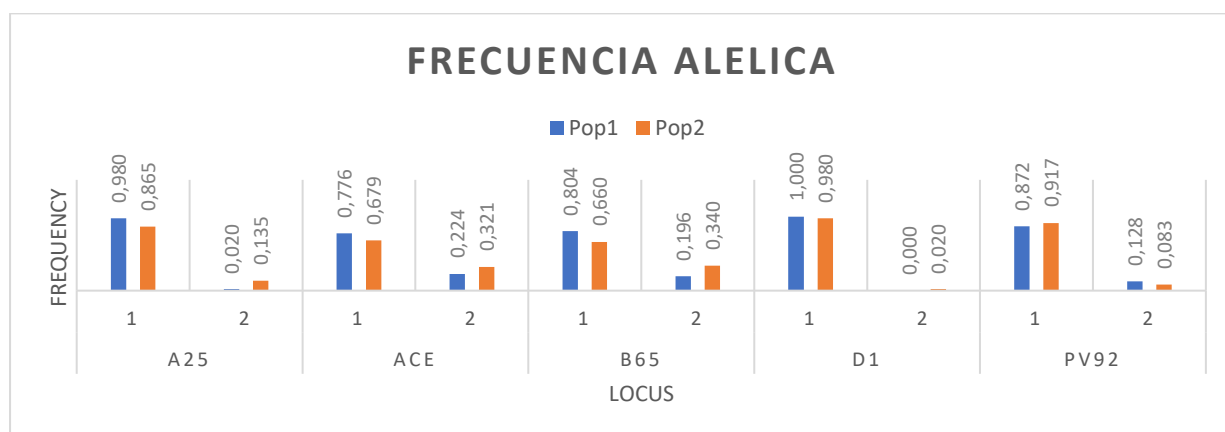


Gráfico 1: Grafico de las frecuencias alélicas por población. Pop1: Tacuarembó, Pop2: Salto. 1: Inserción, 2: Delección.

5.4 Equilibrio Hardy Weinberg

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se calculó el equilibrio Hardy Weinberg.

Los resultados (Tabla 6) muestran que para la población de Tacuarembó las inserciones A25, ACE y B65 tienen un valor P de 0,000 siendo altamente significativo y por tanto no estarían en equilibrio. Por su parte PV92 tiene un valor de P de 0,759 siendo no significativo y estando en

equilibrio. Como se mencionó D1 es monomórfico por lo que no se puede evaluar si está en equilibrio de HW.

Para Salto el análisis de EHW resultó que, para ACE y D1 el valor de P es menor que 0,001 siendo significativo y para B65 es de 0,008 siendo significativo, por tanto, para estas tres inserciones ALU la población no está en equilibrio. En tanto PV92 (0,208) y A25 (0,945) resultaron no significativos estando en equilibrio.

<i>Tabla 6: Equilibrio Hardy Weinberg</i>					
Población	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
Tacuarembó	A25	1	49,000	<0,001	***
	ACE	1	28,717	<0,001	***
	B65	1	34,169	<0,001	***
	D1	Monomórfico			
	PV92	1	0,094	0,759	ns
Salto	A25	1	0,005	0,945	ns
	ACE	1	22,641	<0,001	***
	B65	1	7,073	0,008	**
	D1	1	50,000	<0,001	***
	PV92	1	1,587	0,208	ns
<i>ns=no significativo, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$</i>					

5.5 Heterocigosidad observada y esperada

La desviación del EHW puede deberse al exceso de heterocigotas. La heterocigosidad observada (H_o) es menor en todos los casos a la esperada, habiendo más homocigotos de lo esperado y por tanto menor diversidad genética (tabla 7).

Los valores más cercanos de H_o a la heterocigosidad esperada (H_e) la obtuvo PV92 para la población de Tacuarembó y A25 para la población de Salto.

<i>Tabla 7: Heterocigosidad observada y esperada</i>				
Población	Locus	N	H_o	H_e
Tacuarembó	A25	49	0,000	0,040
	ACE	49	0,082	0,348
	B65	46	0,043	0,315
	D1	48	0,000	0,000
	PV92	47	0,213	0,223
Promedio			0,067	0,185
Salto	A25	52	0,231	0,233
	ACE	53	0,151	0,436
	B65	50	0,280	0,449
	D1	50	0,000	0,039
	PV92	48	0,125	0,153
Promedio			0,157	0,262

5.6 Efecto Wahlund

Teniendo en cuenta los resultados anteriores de EHW se calculó el ajuste de los loci analizados al equilibrio tomando ambas poblaciones como si fuesen una sola. Los resultados se muestran en la tabla 8 y como se puede observar las inserciones A25, ACE Y B65 siguen mostrando desequilibrio.

Tabla 8: Equilibrio Hardy Weinberg tomando ambas poblaciones como una sola.

Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
A25	1	3,535	0,060	ns
ACE	1	52,219	<0,001	***
B65	1	32,075	<0,001	***
D1	1	99,000	<0,001	***
PV92	1	1,099	0,295	ns

*ns=no significativo, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$*

El supuesto del efecto en cuestión resulta de que si tomamos a ambas poblaciones como una sola la heterocigosidad puede reducirse. Como se observa en la tabla 9 el promedio de la heterocigosidad observada es menor a que si tomamos ambas poblaciones por separado ya que según los valores mostrados en la tabla 7 la H_o de Tacuarembó vale 0.067 y la de Salto 0.157, estas dos sumadas dan como resultado 0.224, mayor en comparación a la H_o de Tacuarembó + Salto (una sola población) que fue de 0.113.

Tabla 9: Heterocigosidad observada y esperada si ambas poblaciones fuesen una.

Población	Locus	N	H_o	H_e
Población (Tacuarembó+ Salto)	A25	102	0,118	0,145
	ACE	103	0,117	0,405
	B65	96	0,167	0,395
	D1	99	0,000	0,020
	PV92	96	0,167	0,187
Promedio			0,113	0,230

5.7 Estadísticos F (Fit, Fis, Fst)

Para el parámetro Fis los valores se encuentran entre 0,100 (PV92) y 1,000 (D1) (tabla 10), todos los valores son positivos mostrando un déficit de heterocigotos y por tanto congruentes con los resultados obtenidos de heterocigosidad observada.

El rango para el parámetro Fit oscila entre 0,105 (PV92) y 1,000 (D1), como se observa en tabla 10.

Por último, se calculó Fst, obteniendo los resultados que se observan en la tabla 10, siendo el rango obtenido de 0,005 (PV92) a 0,046 (A25) revelando una diferenciación genética pequeña. Además, se calculó el total de los estadísticos F, resultando un Fis de 0,507, el Fit de 0,519 y Fst de 0,020.

<i>Tabla 10: Estadísticos F</i>				
Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
A25	0,155	0,193	0,046	5,232
ACE	0,703	0,707	0,012	21,149
B65	0,576	0,588	0,027	9,161
D1	1,000	1,000	0,010	24,500
PV92	0,100	0,105	0,005	47,778
Promedio	0,507	0,519	0,020	21,564

5.8 Identidad genética y distancia estándar (Da) genética de Nei (1972)

La identidad genética de Nei arroja un valor de 0,989 siendo muy cercano a 1 y por tanto se observa que las poblaciones son muy similares, pero no idénticas.

En cuanto a la distancia genética los resultados muestran una distancia genética pequeña entre las poblaciones, teniendo un valor de 0.011.

5.9 Distancia de Reynolds (1983)

Se calculó la distancia genética de Reynolds, que como se mencionó utiliza el parámetro Fst para medir la diferenciación genética.

Los resultados se observan en la tabla 11 dando un valor de 0,02124 y por tanto al igual que distancia de Nei demuestra una diferencia genética pequeña.

Tabla 11: Distancia de Reynolds		
Población	Tacuarembó	Salto
Tacuarembó	0,00000	
Salto	0,02352	0,00000
0 a 0,05= diferencia pequeña; 0,05 a 0,15= diferencia moderada; 0,15 a 0,25=diferencia grande		

5.10 Dendrograma (UPGMA)

Utilizando la distancia genética de Nei et al., (1983) se elaboró a través del paquete PHYLIP una matriz de distancia (tabla 12) que luego se utilizó para construir dendrogramas a través del método UPGMA con el paquete FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2019). Los resultados se observan en las figuras 3 y 4.

En la figura 3 se observa el dendrograma donde fueron incluidas solamente las poblaciones uruguayas, evidenciado que Tacuarembó presenta mayor cercanía a vascos de Montevideo que con la población de Salto.

Cuando se incluyen otras poblaciones se aprecia que las poblaciones de Tacuarembó y Salto, si bien pertenecen al mismo grupo, presentan una diferencia, quedando Salto agrupada y con estrecha proximidad con la población de Montevideo. Además, se aprecia que todas las poblaciones uruguayas, con excepción de vascos de Trinidad, agrupan juntas.

La población vascos de Trinidad presenta mayor cercanía con poblaciones europeas. Además, en el dendrograma (figura 4) se aprecian bien definidos los grupos de poblaciones africanas y amerindias.

Tabla 12: Matriz de distancia genética Nei DA					
	Tacuarembó	Salto	Montevideo	Vascos Trinidad	Vascos Montevideo
Tacuarembó	0,000000				
Salto	0,013869	0,000000			
Montevideo	0,014408	0,000497	0,000000		
Vascos Trinidad	0,037746	0,007670	0,006847	0,000000	
Vascos Montevideo	0,003018	0,008187	0,008343	0,030314	0,000000

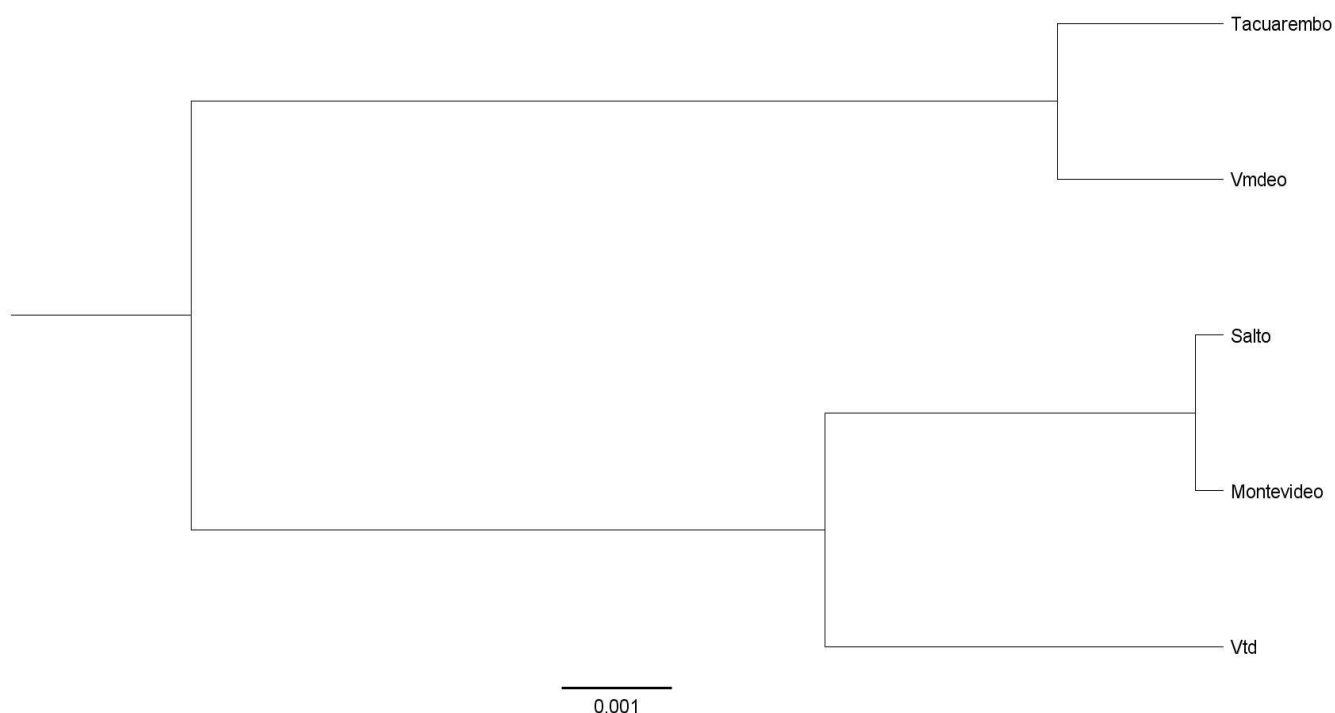


Figura 3: Dendrograma a partir de distancias genéticas de Nei a través de método UPGMA utilizando solamente las poblaciones uruguayas. Vmdeo: vascos Montevideo; Vtd: vascos Trinidad

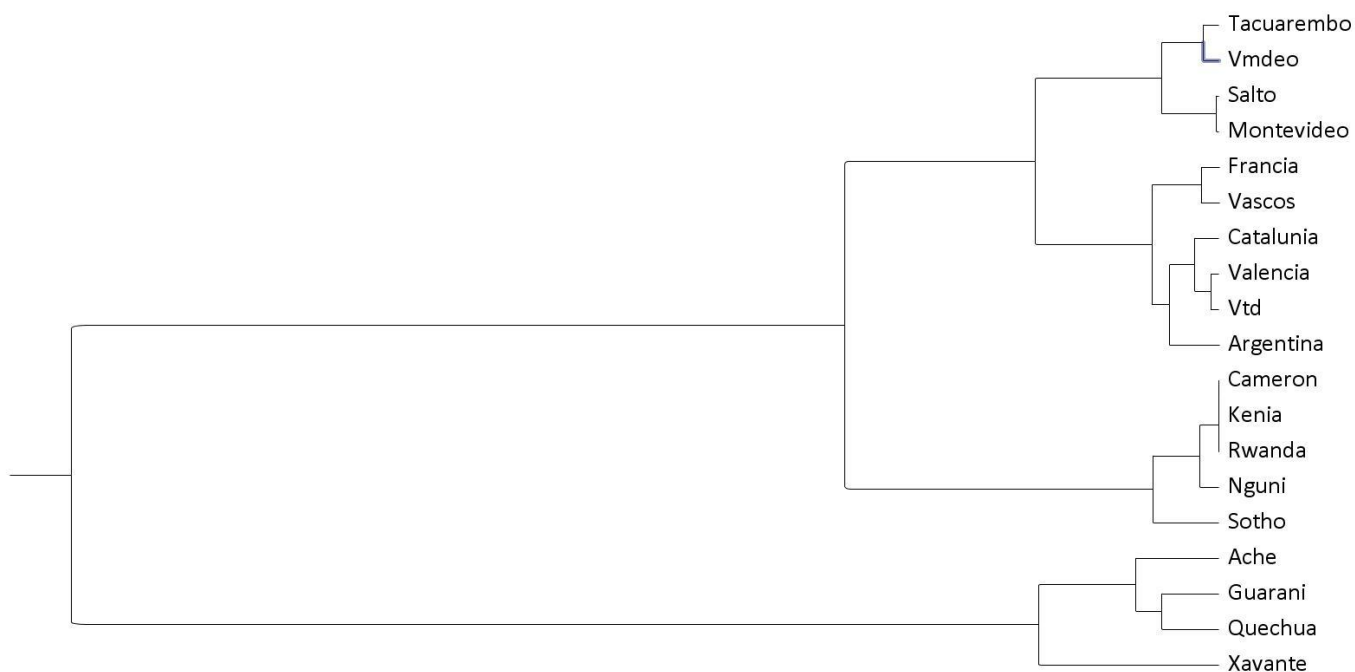


Figura 4: Dendrograma a partir de distancias genéticas de Nei a través de método UPGMA utilizando poblaciones amerindias, europeas, africanas y latinoamericanas (poblaciones uruguayas y de argentina). Vmdeo: vascos Montevideo; Vtd: vascos Trinidad

Tabla 13: Poblaciones consideradas para realizar dendrograma

Tacuarembó	Presente trabajo
Salto	Presente trabajo
Montevideo	Hidalgo et.al., 2014
Vascos de Trinidad	Hidalgo et.al., 2014
Vascos de Montevideo	Hidalgo et.al., 2014
Francia	Romualdi et al., 2002
Catalunia	Comas et al., 2000
Valencia	García-Obregón et al., 2006
Vascos	García-Obregón et al., 2006
Ache	Battilana et al., 2002
Guaraní	Battilana et al., 2002
Quechua	Gaya-Vidal et al., 2010
Xavante	Battilana et al., 2006
Sotho	Stoneking et al., 1997
Nguni	Stoneking et al., 1997
Kenia	Terreros et al., 2009
Cameron	Terreros et al., 2009
Rwanda	Terreros et al., 2009
Argentina (Traslasierra)	Díaz- Rousseau et al., 2018

6 Discusión

En cuanto a los genotipos ambas poblaciones se comportaron de la misma manera, con un número mayor de homocigotos para el genotipo D/D, lo cual coincide con lo expuesto anteriormente en la introducción y antecedentes, sobre el estado ancestral de las inserciones ALU, que es la ausencia o delección (Batzner y Deininger, 2002).

Comparando ambas poblaciones en cuanto a lo último mencionado, Tacuarembó presenta mayor frecuencia de homocigotos D/D y en general mayor frecuencia para la delección. En cuanto a homocigotos I/I Salto presentó mayor frecuencia en comparación con Tacuarembó para todo los insertos ALU con la excepción de A25 en donde presentan la misma frecuencia (2%). Para heterocigotos también es Salto quien presenta mayor frecuencia en general. Por tanto, podemos observar que las poblaciones tienen diferentes proporciones de presencia de las inserciones ALU, siendo más frecuentes en la población de Salto. El único inserto ALU que mostro mayor frecuencia de inserción para Tacuarembó fue PV92. Se puede observar, a partir de esta comparación, que la población de Tacuarembó para las inserciones ALU estudiadas, se encuentra en una posición más ancestral que la de Salto.

Las poblaciones con posición más ancestral son las poblaciones africanas (Watkins et al., 2001), las cuales presentan una frecuencia de inserción menor que poblaciones fuera de África, las cuales tienden a aumentar la frecuencia de inserción observándose las más altas en amerindios (Stoneking et al., 1997), lo cual es interesante ya que en investigaciones anteriores realizadas

en el departamento de Tacuarembó utilizando inserciones ALU (Vega et al., 2020) los porcentajes de aporte genético favorecen al africano frente al amerindio.

En el presente trabajo se obtuvo como resultado que todas las inserciones ALU se mostraron polimórficas con la excepción de D1 en Tacuarembó que resultó ser monomórfico para la delección. Además, para la población de Salto, si bien D1 es polimórfico, se observó una frecuencia de inserción baja de 0,020. En principio esto se puede atribuir al hecho de que la muestra es pequeña, así como también al azar en el momento del muestreo. Otra causal podría ser la presencia de alelos nulos y pérdida alélica o efecto drop-out. En cuanto a alelos nulos se dan cuando existe una mutación o variación en la secuencia de la región de unión de los primers (cebadores) produciendo una falla en la PCR, por la cual no amplifica el alelo (Chapuis y Estoup, 2007) causando que se observen homocigotos que en realidad son heterocigotos.

El caso de D1 monomórfico se evidenció también en el trabajo de Stoneking, et al (1997) enfocado en las poblaciones africanas. En el mismo la población era pequeña, ya que la subpoblación que resultó ser monomórfica para D1 fue la de nigerianos y solo habían 11 en la muestra total. Igualmente, el trabajo mencionado llevó a poner el foco en estas poblaciones, observando y comparando las frecuencias alélicas en poblaciones africanas con poblaciones europeas o amerindias, podemos apreciar que para D1 es mucho más frecuente la delección que la inserción, observando que en África subsahariana el valor de frecuencia de la delección es de 0,706 (Terreros et al., 2009), en los Nguni es de 0,730 y en Sotho es de 0,690 (Stoneking et al., 1997), para Bantu es de 0,790 (Romualdi et al., 2002).

Estudios con estos marcadores (inserciones ALU) en la población de Tacuarembó mostraron que el aporte africano resultó ser de un 30%, mayor de lo encontrado previamente con marcadores clásicos (Vega et al., 2020). En dicha investigación la frecuencia de delección (ausencia de inserción) en la población Tacuarembó para la inserción ALU D1 fue de 0,805, siendo una frecuencia alta. Además, parece ser un resultado congruente con lo que se observa en poblaciones de Montevideo y vascos de Montevideo que arrojaron una frecuencia para la delección de 0,704 y 0,722 respectivamente para dicho marcador (Hidalgo et al., 2014).

Teniendo en cuenta estos puntos tratados se podría pensar que algún factor o fuerza evolutiva podría estar actuando en las poblaciones por lo que podríamos discutir los resultados del equilibrio Hardy Weinberg.

Para la muestra de Tacuarembó se observa que tres marcadores (A25, ACE y B65) tienen un valor de p de 0,000 lo que indica que son significativos y no estarían en equilibrio de HW, D1 al ser monomórfico no se puede calcular su valor de p y la única inserción ALU en equilibrio de HW es PV92. Por su parte Salto también presenta para ciertos ALU una situación similar, siendo ACE, D1 y B65 las inserciones ALU que no se encuentran en el equilibrio de HW. Algunos de estos marcadores ya han presentado desviaciones del equilibrio de HW en trabajos realizados en el país, como es el caso de Vega et al., (2020) con la inserción ACE para la población de Tacuarembó y la investigación de Hidalgo et al (2014) para D1 en las tres poblaciones en estudio (Montevideo, vascos de Montevideo y vascos de Trinidad) y B65 en vascos de Trinidad.

Para que las poblaciones estén en equilibrio de HW deben de cumplir con ciertas condiciones y cualquier alteración de las mismas provocaría un desequilibrio del modelo teórico. Dicho

desequilibrio sería muestra de que hay alguna fuerza evolutiva, sistemática o aleatoria actuando o que las poblaciones no son estáticas (Herrera-Paz, 2013)

La frecuencia de homocigotos fue alta para ambas poblaciones, por lo que es esperable que la heterocigosidad observada sea menor que la esperada, lo cual es corroborado en nuestro análisis. Un número menor de heterocigotos se puede traducir en una menor diversidad génica, como es el caso del estudio realizado por Gómez-Pérez et al., (2011) en poblaciones amerindias. Nuevamente se puede atribuir a estos resultados al tamaño de la muestra que al ser pequeña puede afectar las proporciones de los genotipos, y a la deriva génica.

Además del tamaño muestral y la selección natural se podría estar presenciando un efecto Wahlund (1928), que sucede cuando dos poblaciones o más se diferencian en cuanto a frecuencias alélicas y genotípicas no se mezclan produciendo un aumento de homocigotos en ciertos locus específicos. Dicho efecto indica una posible estructuración de la población generándose subpoblaciones. Según Díaz-Rousseau et.al (2018) se puede analizar este efecto utilizando a las muestras de las diferentes poblaciones como una sola y evaluando la heterocigosidad, la cual debería ser menor. Es por esto que se evaluó tanto para el equilibrio Hardy Weinberg como para heterocigosidad dicho efecto, utilizando ambas poblaciones como una sola. Efectivamente como resultado se obtuvo una menor heterocigosidad. Los resultados muestran que para el EHW se mantiene el desequilibrio en las inserciones ACE, B65 y D1 y en cuanto a la heterocigosidad se observa una reducción de la misma. Teniendo en cuenta todo ello podría ser un factor más para explicar los resultados.

Siguiendo el análisis se realizaron los estadísticos F de Wright (1951). Para Fis, el coeficiente de endogamia local o intrapoblacional, en concordancia con los resultados anteriores muestra un déficit de heterocigotos y un aumento de homocigotos producidos por posible endogamia.

El valor de Fst (coeficiente de diferenciación interpoblacional) fue de 0,020, siendo estrictos, un valor mayor que cero, el cual indicaría una estructuración o subdivisión de la población, mostrando que estas poblaciones se comportan como dos diferentes y no como una sola, pero la realidad es que hay que tener en cuenta que el valor está muy cercano a cero, lo cual, en realidad, según Demarchi, (2014) indicaría un alto nivel de flujo génico y poca diferenciación entre poblaciones. Un indicativo de este alto flujo génico puede ser el valor de Nm resultante a partir de Fst con valor de 21,564, que es mucho mayor que 1, sobrepasando los efectos de la deriva génica (Slatkin, 1994).

Hasta el momento se planteó solo lo referente a los resultados en cuanto a las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas, así como también a los análisis posteriores que se pudieron realizar. Lo siguiente es plantear lo referido a la distancia genética entre las poblaciones de Tacuarembó y Salto, para ello se emplearon dos métodos, la distancia genética de Nei (1972) y la distancia de Reynolds et al., (1983). Ambas distancias presentaron una diferencia pequeña entre poblaciones, la distancia de Nei (1972) resultó ser de 0,011 y la de Reynolds de 0,02352. Si bien ambas demuestran y coinciden en que hay una diferencia genética pequeña, la distancia de Nei resulta ser menor, probablemente porque además de tomar en cuenta la deriva génica también toma a las mutaciones como fuerza evolutiva actuante, pudiendo este equilibrio mutación – deriva génica reducir la distancia entre poblaciones y atribuir parte de la diferencia

genética a la mutación. Hay que tener en cuenta que los efectos de la deriva génica aumentan en poblaciones pequeñas (Relethford, 2012).

Según Demarchi (2014) para que la distancia genética sea pequeña deben actuar ciertos factores, tales como, compartir ancestro común reciente, que haya flujo génico y que la selección natural actúe de la misma manera en ambas poblaciones. Dicho autor menciona que el flujo génico tiende a disminuir las distancias genéticas y la deriva génica a aumentarlas. Tomando en cuenta lo anterior respecto a los resultados de F_{st} , se puede considerar que hay un efecto del flujo génico entre las poblaciones que reduce la distancia genética, pero no la hace inexistente, ya que se pudo apreciar diferencia pequeña entre ambas.

Para evaluar las relaciones de distancias entre las poblaciones se construyeron dendrogramas a través del método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) y tomando como matriz la distancia de Nei et al., (1983). Se elige utilizar esta matriz de distancia ya que Hidalgo et al., (2014) y Vega et al., (2020) la utilizan en sus investigaciones y así poder comparar los resultados con los obtenidos en este trabajo.

La distancia entre Tacuarembó y Salto nuevamente se observa pequeña de 0,013869, resultando un valor similar al obtenido a través del cálculo de distancia de Nei (Da). Entre Tacuarembó y Montevideo el valor fue de 0,0144 mayor a la encontrada en el trabajo de Vega et al., (2020) con valor de 0,0021 y por tanto presentando mayor distancia genética. En el caso de Tacuarembó - vascos de Montevideo, y Tacuarembó - vascos de Trinidad los valores resultaron ser muy similares entre ambas investigaciones. Cabe recordar que en la presente investigación se utilizaron una menor cantidad de inserciones ALU que en el mencionado trabajo, lo cual puede ser causante de la diferencia en los resultados.

También es interesante el hecho de que el resultado de la distancia genética entre Tacuarembó - Salto, y Tacuarembó - Montevideo es muy similar, mostrando cierta homogeneidad en cuanto a distancia genética en las poblaciones departamentales del país. Cabe mencionar además que Salto mostro ser muy próximo a Montevideo con un valor de distancia genética de 0,00049.

En cuanto a el primer dendrograma realizado se incluyeron solo con poblaciones uruguayas, pudiendo observar que se forman dos conglomerados o *clusters*, uno con la población de Tacuarembó y vascos de Montevideo, y otro con las demás que incluye a Salto. Además, en este primer dendrograma se pudo apreciar que la población de Salto tiene mayor proximidad con la población de Montevideo, lo cual es interesante desde el punto de vista de la configuración genética de estas poblaciones. Para tener mayor distinción y además un panorama más global, se agregaron poblaciones del continente propio y de otras regiones continentales. Allí se formaron cuatro conglomerados diferenciados, el amerindio, el africano, un tercero formado por poblaciones europeas y argentina y un cuarto formado por poblaciones uruguayas (Salto, Tacuarembó, vascos de Montevideo y Montevideo). Las agrupaciones resultantes dieron resultados similares a las investigaciones de Hidalgo et al., (2014) y Vega et al., (2020) en donde las poblaciones uruguayas resultaron próximas al grupo europeo, pero con mayor cercanía entre ellas. En el caso de la población de vascos de Trinidad, al igual que en trabajos mencionados anteriormente, agrupa con poblaciones europeas españolas.

Además, cabe destacar el gran poder discriminatorio de las inserciones ALU para establecer relaciones genéticas y geográficas ya que en el presente trabajo se utilizaron solamente 5 de ellas obteniendo resultados similares con trabajos que utilizan mayor cantidad de marcadores, como lo son Hidalgo et al., (2014), Vega et al., (2020) y Diaz- Rousseau et al., (2018).

7 Conclusiones:

Se cumplieron todos los objetivos plantados, las principales conclusiones obtenidas son:

- Las poblaciones demostraron tener un alto porcentaje de homocigotos de genotipo D/D, con mayor frecuencia en la población de Tacuarembó. Salto mostró ser más variable en cuanto a las frecuencias alélicas y genotípicas, mostrando mayor número de genotipos I/I e I/D.
- Ambas poblaciones muestran un exceso de homocigotos, lo cual puede estar afectando el equilibrio de Hardy Weinberg en la mayoría de las inserciones. Esto demuestra que hay algún efecto, factor o fuerza evolutiva actuante. Uno de estos factores es la endogamia y consanguinidad, ya que mostró tener valores positivos de Fis y Fit determinando un déficit de heterocigotos.
- Las poblaciones mostraron un grado de estructuración bajo evaluado por el estadístico Fst y apoyado por el efecto Wahlund.
- Se apreció una pequeña distancia genética entre ambas poblaciones.
- El flujo genético entre Tacuarembó y Salto pudiera ser la causa de los valores pequeños de Fst y de las distancias genéticas.
- En cuanto a el agrupamiento, se vio que Salto y Tacuarembó agruparon en un mismo cluster pero separadas, esto quiere decir que la población de Salto es más similar a la población de Montevideo que a la de Tacuarembó.
- El presente trabajo incrementa el conocimiento de la relación genética existente entre las dos poblaciones de nuestro país.

Como consideración final se piensa que se podría ampliar el estudio de diferentes maneras, tales como:

- Aumentar el número de marcadores (inserciones ALU) ya que a mayor cantidad podríamos obtener mayor poder de resolución de procesos evolutivos.
- Agregar poblaciones de otros departamentos y aumentar el número de la muestra.
- Realizar análisis de mestizaje para obtener porcentajes de ancestralidad para complementar la información que proporciona el estudio de las inserciones ALU.

8 Bibliografía:

Aranguren-Méndez, A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., Jordana, J. 2005. Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 13(1): 30-42

Arocena, F. 2013. Uruguay: un país más diverso que su imaginación. Una interpretación a partir del censo de 2011. En Revista de Ciencias Sociales, DS-FCS, vol. 26, n. 33. 137-158

Battilana, J., Bonatto, L., Freitas, L., et al. 2002. Alu insertions versus blood group plus protein genetic variability in four Amerindian populations. Annals of Human Biology. 29:334-347.

Battilana, J., Fagundes, N., Heller, A., Goldani, A., Freitas, L. B., Tarazona-Santos, E., Bonatto, S. L. 2006. Alu insertion polymorphisms in Native Americans and related Asian populations. Annals of Human Biology, 33(2), 142-160.

Batzer MA, Stoneking M, Alegria-Hartman M, Bazan H, Kass DH, Shaikh TH, Novick GE, Ioannou PA, Scheer WD, Herrera RJ, et al. 1994. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. Proc Natl Acad Sci U S A.

Batzer, MA., Deininger, PL. 2002. Alu repeats and human genomic diversity. Nature Reviews Genetics 3: 370–379.

Bracco, D. 2004. Charrúas, Guenoas y Guaraníes: Interacción y Destrucción: Indígenas en el Río de la Plata. Montevideo, Uruguay: Linardi & Risso.

Bertoni, B., Jin, L., Chakraborty, R., & Sans, M. 2005. Directional mating and a rapid male population expansion in a hybrid Uruguayan population. American Journal of Human Biology, 17(6), 801–808.

Bonilla, C., Bertoni, B., Gonzalez, S., et al. 2004. Substantial Native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals pastn episodes of sex-biased gene flow. American Journal of Human Biology, 16: 289-297-878.

Cabrera, L., Barreto, I. 2005. El ocaso del mundo indígena y las formas de integración a la sociedad urbana montevideana. En Revista TLFROS. vol. 4, n. 2. 2006. 1-19.

Cavalli-Sforza, L., Edwards, A. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. American journal of human genetics. 19(3 Pt 1), 233–257.

Chapuis, MP., Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Bio Evol* 24: 621-631. *Molecular biology and evolution*.

Comas, D., Calafell, F., Benchemsi, N. et al. 2000. Alu insertion polymorphisms in NW Africa and the Iberian Peninsula: Evidence for a strong genetic boundary through the Gibraltar Straits. *Human Genetics*. 107:312-319.

Demarchi, A. 2009. Microsatélites, distancias genéticas y estructuras de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*. 11(1):73-88.

Demarchi, A. 2014. Análisis de la estructura genética en poblaciones nativas del Gran Chaco. *Folia Histórica del Nordeste*, (22), 169-185.

Díaz-Rousseau, G., García, A., Demarchi, A. 2018. Análisis de la estructura genética del Valle de Traslasierra a partir de inserciones Alu. *Revista Argentina De Antropología Biológica*, 21(1).

Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales (IMPO). (SF). Ley N° 158
DIVISION ADMINISTRATIVA. DEPARTAMENTOS DE TACUAREMBO, SALTO Y PAYSANDU.
<https://www.impo.com.uy/bases/leyes/158-1837>

Di Santo, M. 2018. Diversidad genética de la región no pseudoautosómica del cromosoma X en las poblaciones de Corrientes y Misiones: determinación de marcadores poblacionales y marcadores para identificación. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento ciencias biológicas.

Excoffier, L., Smouse, P., Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.

Figueiro, G. 2006. Estudio de las características y la continuidad de la población prehistórica de Arroyo Seco, Argentina, a través del ADN mitocondrial. Tesis de maestría, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias – PEDECIBA.

Felsenstein, J. 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6a3. Distributed by the author. Seattle: Department of Genome Sciences, University of Washington.

García-Obregón, S., Alfonso Sánchez, M. A., Pérez Miranda, A. M. et al. 2006. Genetic position of Valencia (Spain) in the Mediterranean basin according to Alu insertions. *American Journal of Human Biology*. 18:187-195.

Gómez-Pérez, L., Alfonso Sánchez, M. A., Pérez Miranda, A. M. et al. 2007. Utilidad de las inserciones Alu en los estudios de mestizaje. *Antropo*, 14, 29-36.

Gayà-vidal, M., Dugoujon, J. M., Esteban, E., Athanasiadis, G., Rodríguez, A., Villena, M. y Moral, P. 2010. Autosomal and X chromosome Alu insertions in Bolivian Aymaras and Quechuas: two languages and one genetic pool. *American Journal of Human Biology*, 22(2), 154-162

Gómez-Pérez, L., Alfonso-Sánchez, M. A., Sánchez, D., García-Obregón, S., Espinosa, I., Martínez-Jarreta, B., De Pancorbo, M. M., & Peña, J. A. 2011. Alu polymorphisms in the Waorani tribe from the Ecuadorian Amazon reflect the effects of isolation and genetic drift. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*, 23(6), 790–795.

Häsler, J., Strub, K. 2006. Alu elements as regulators of genet expresión. *Nucleic Acids Res*, 34: 5491-5497

Hedrick, P. 2005. *Genetic of populations*. 3a ed. Boston, mA: Jones and Bartlett.

Herrera-Paz, E. 2013. La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *Revista médica hondureña*, Vol. 81, No. 1.

Hidalgo, P., Mut, P., Ackermann, E., Figueiro, G., Sans, M. 2014. Questioning the “Melting Pot”: Analysis of Alu Inserts in Three Population Samples from Uruguay. *Human Biology*, 86 (2): 83-92. Wayne State University Press.

Instituto Nacional de estadística – INE. 2011. Censo 2011.

<https://www.ine.gub.uy/tacuarembu2>

Mut Badía, P. 2019. Estudio de ancestría y linajes paternos en la población uruguaya a través del análisis de marcadores moleculares del cromosoma Y. Tesis de maestría. Montevideo: Udelar. FC- PEDECIBA, 2019

National Human Genome Research Institute, 2006. “Variabilidad genética”.

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Variabilidad-genetica>

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Nat* 106:283-292.

Nei M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of human genetics*, 41(2), 225–233.

Nei, M., Tajima, F., Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Gene frequency data. J Mol Evol. 1983;19(2):153-70

Observatorio Territorio Uruguay – OPP. (sf). Tacuarembó.

<https://otu.opp.gub.uy/perfiles/tacuarembó>

Peakall, R., Smouse, PE. 2012. GenAEx 6.5: análisis genético en Excel. Software de genética de poblaciones para la enseñanza y la investigación: una actualización. Bioinformática Oxford, Inglaterra., 28 (19), 2537–2539.

Pi Hugarte, R., Vidart, D. 1969. El legado de los inmigrantes. Nuestra Tierra. P 7-12. Montevideo

Rambaut, A. 2019. Figtree v1.4.4. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Relethford, J. 2012. Human Population Genetics. Wiley-Blackwell, New York

Resano, M. 2018. Mestizaje genético en las poblaciones humanas de Argentina Tesis de doctorado. Barcelona. Universitat de Barcelona. Departament de Biología Evolutiva, Ecología i Ciències.

Reynolds, J., Weir, BS., Cockerham, CC. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. Genetics 105:767-779

Rogers, JS. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distances. Studies in Genet VII 7213:145-153.

Romualdi, C., Balding, D., et al. 2002. Patterns of human diversity, within and among continents, inferred from biallelic DNA polymorphisms. Genome Res . 12:602-612.

Sans, M., Salzano, F. M., Chakraborty, R. 1997. Historical genetics in Uruguay: Estimates of biological origins and their problems. Human Biology, 69(2), 161-170.

Sans, M. 2009. “Raza”, adscripción étnica y genética en Uruguay. Runa XXX, (2), pp 163-174, 2009 FFyL- UBA –

Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. En Ecological Genetics, Editado por L. Real. Princeton

Sneath, P., Sokal, R. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco: Freeman.

Stoneking, M., Fontius, J. J., Clifford, S. L., Soodyall, H., Arcot, S. S., Saha, N., Jenkins, T., Tahir, M. A., Deininger, P. L. y Batzer, M. A. 1997. Alu insertion polymorphisms and human evolution: Evidence for a larger population size in Africa. *Genome Research*, 7, 1061-1071.

Sayed-Tabatabaei, F.A., Oostra, B.A., Isaacs, A., van Duijn, C.M., Witteman, J.C. 2006. ACE polymorphisms. *Circulation Research* 98:1123-1133.

Soler Cantera, A. 2021. Farmacogenética de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica en Uruguay. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias-PEDECIBA.

Terreros, M. C., M. A. Alfonso Sánchez, G. E. Novick et al. 2009. Insights on human evolution: An analysis of Alu insertion polymorphisms. *Journal of Human Genetics*. 54:603-611.

Vega-Requena, Y., Hidalgo, P. C., Ackermann, E., Flores-Gutierrez, S., Sans, M. 2020. Genetic Admixture Analysis in the Population of Tacuarembó-Uruguay Using *Alu* Insertions. *Human biology*, 91(4), 249–256.

Venugopal, V., Partibha Nallari. 2006. Population genetics. Kalyani Publishers

Wahlund, S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus Betrachtet. *Hereditas*, 11, 65-106.

Watkins, W. S., Ricker, C. E., Bamshad, M. J., Carroll, M. L., Nguyen, S. V., Batzer, M. A., Harpending, H. C., Rogers, A. R., & Jorde, L. B. 2001. Patterns of ancestral human diversity: an analysis of Alu-insertion and restriction-site polymorphisms. *American journal of human genetics*, 68(3), 738–752.

Weiner, A., Deininger, P., Efstratiadis, A. 1986. Nonvarial retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annu Rev Biochem*, 55:631-66

9 Anexos:

Anexos I:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO: Variabilidad genética humana en la región norte del Uruguay y aspectos microevolutivos subyacentes

Lugar y fecha _____ Código de laboratorio _____

Responsables:

Dra. Mónica Sans, Departamento de Antropología Biológica
Facultad de Humanidades y C.Educación, Udelar.
E-mail: mbsans@gmail.com, teléfono: (5982) 2408 9247

Dr. Sc. Pedro C. Hidalgo. PDU Diversidad Genética Humana
Centro Universitario de Tacurembó, Udelar.
E-mail: drpedro.hidalgo@gmail.com, teléfono : (5598) 4632 3911

Expreso mi consentimiento para participar en el presente proyecto sobre "Variabilidad genética en el norte del Uruguay y procesos microevolutivos". Declaro que he nacido (o que vivo desde niño/a) en la región en estudio, que han definido para que yo conozca. Acepto que se me tome una muestra de saliva, lo cual no implica ningún riesgo para mí, de la cual extraerán ADN para estudiar características genéticas no visibles que heredé por las líneas materna, paterna y biparental, y que ninguna de estas características se relaciona con enfermedades genéticas. También, acepto responder un breve cuestionario en el que me pedirán datos generales y genealógicos, pero fui informado/a de que podré responder la totalidad o una parte.

Los datos que se obtengan serán útiles para comprender cómo se formó la población del Uruguay así como de la región en la que vivo, junto con datos históricos, genealógicos y demográficos.

Declaro que he recibido toda la información necesaria de lo que comprende el proyecto y que tuve la oportunidad de formular todas las preguntas necesarias para mi entendimiento, las cuales fueron respondidas con claridad y profundidad. Asimismo, se me comunicó que la información sobre mi identidad será mantenida a resguardo confidencial, que solo los directores del proyecto conocerán mi identidad (para que puedan comparar con otros datos mencionados arriba), y que los resultados serán comunicados a población a la que pertenezco, así como en otros ámbitos, sin identificar a quienes aportamos las muestras. Me han comunicado que podré retirarme del proyecto en cualquier momento, y que, de solicitarlo, tendré acceso a los resultados del análisis de la muestra que cedí voluntariamente luego de finalizado el proyecto.

Dejo a constancia que mi participación es voluntaria y que comprendo los alcances de la misma, y firmo el presente consentimiento del que recibo una copia firmada.

NOMBRE Y APELLIDO DEL PARTICIPANTE: _____

Cédula Identidad: _____ Credencial Cívica _____ Firma: _____

NOMBRE Y APELLIDO DE QUIEN TOMA LA MUESTRA: _____

Documento de Identidad: _____ Firma: _____

Cuestionario:

Código Laboratorio: _____ Entrevistado por: _____

DATOS PERSONALES:

Apellido Paterno: _____ Apellido Materno: _____

Nombres: _____ Sexo: M _____ F _____

CI: _____ - _____ Credencial /serie/número o departamento: _____ - _____

Cambió el departamento de la credencial? _____ cuándo? _____

Edad Cumplida. _____ Fecha Nac. ____/____/____ Atención salud en: _____

Email _____ Direcc. Actual. _____

Cel o Tel _____ Lugar Nacim (ciudad o localidad). _____

Departamento _____ Rural _____ Suburbano _____ Urbano _____

Escolaridad terminada: Primaria: _____ Secundaria: _____ Terciaria: _____

Grupo Sanguíneo: ABO: _____ Rh: _____ No. Hermanos (Incl. el encuestado): M: _____ F: _____.

No. Hijos: M: _____ F: _____. Gemelos: _____ MZ _____ DZ _____.

¿Tiene alguna característica hereditaria que quiera compartir con nosotros? ¿o alguna característica frecuente en su familia? _____

¿Su Padre y su Madre son Familiares entre sí?: si _____ no _____ Grado: _____.

Conoce si tiene ancestros: europeos _____ africanos _____ indígenas americ. _____

Datos de la Madre:

Apellido Paterno _____ Materno _____ Nombre _____

Lugar Nac (ciudad o localidad). _____

Departamento _____ Rural _____ Suburbano _____ Urbano _____

¿Vive?: _____ ¿Fallecida?: _____. Edad: _____. Causa: _____.

Datos del Padre:

Apellidos Paterno: _____ Paterno: _____ Nombre: _____

Lugar Nac (ciudad o localidad). _____

Departamento _____ Rural _____ Suburbano _____ Urbano _____

¿Vive?: _____ ¿Fallecida?: _____. Edad: _____ Causa: _____.

Anexo II: Protocolo extracción de ADN

1. Centrifugar 500 ul de saliva a 2500 rpm durante 10 min
2. Descartar sobrenadante
3. Colocar 500 ul de Ringer lactato
4. Vertexear
5. Centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm
6. Descartar sobrenadante
7. Agregar 500 ul de solución de lisis celular + 15 ul de Proteinasa K (20 mg/ml)
8. Dejar en baño caliente como mínimo 1 hora a 60° C
9. Agregar acetato de amonio (precipitado de proteínas) y agitar en vortex por 20 segundos
10. Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos
11. Transferir sobrenadante a un eppendorf con 700 ul de isopropanol a – 20° C y agitar.
12. Centrifugar por un minuto a máxima velocidad y descartar sobrenadante
13. Lavar el pellet con 500 ul de etanol 70% a 4°C
14. Centrifugar por un minuto a máxima velocidad y descartar sobrenadante.
15. Secar pellet sobre papel filtro por 1 hora.
16. Suspender pellet en 50 ul de agua destilada o buffer TE 1x.
17. Resuspender pellet en baño caliente a 37°C por 1 hora.

Anexo III: Secuencia Primers utilizados

Forward	Reverse
ACE-f: CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT	ACE-r: GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T
PV92-f: AAC TGG GAA AAT TTG AAG AGA AAG T	PV92-r: TGA GTT CTC AAC TCC TGT GTG TTA G
D1-f: TGC TGA TGC CCA GGG TTA GTA AA	D1-r: TTT CTG CTA TGC TCT TCC CTC TC
A25-f: CCA CAA ATA GGC TCA TGT AGA AC	A25-r: TAT AAT ATG GCC TGG ATT ATA CC
B65-f: ATA TCC TAA AAG GGA CAC CA	B65-r: AAA ATT TAT GGC ATG CGT AT

Anexo IV: Protocolos de PCR para las inserciones Alu estudiadas:

A25:

Reactivos	Concentración	Volumen x1	Ciclado	
H2O	Libre de nucleasas	10 uL	Temperatura	Tiempo
Buffer	10x Invitrogen	1.5 uL	95°C	6 minutos
MgCl2	50 mM	0.95 uL	95°C	1 minuto
DNTP's	2 mM	1.25 uL	58°C	1:30 minutos
A25 f	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	1:30 minutos
A25 r	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	5 minutos
Taq polimerasa invitrogen		0.125 uL	8°C	infinito
Total mix		15.075 uL		
ADN muestra		1 uL		

ACE:

Reactivos	Concentración	Volumen x1	Ciclado	
H2O	Libre de nucleasas	10 uL	Temperatura	Tiempo
Buffer	10x Invitrogen	1.5 uL	95°C	6 minutos
MgCl2	50 mM	0.95 uL	95°C	1 minuto
DNTP's	2 mM	1.25 uL	56°C	1:30 minutos
A25 f	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	1:30 minutos
A25 r	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	5 minutos
Taq polimerasa invitrogen		0.125 uL	8°C	infinito
Total mix		15.075 uL		
ADN muestra		1 uL		

B65:

Reactivos	Concentración	Volumen x1	Ciclado	
H2O	Libre de nucleasas	10 uL	Temperatura	Tiempo
Buffer	10x Invitrogen	1.5 uL	95°C	6 minutos
MgCl2	50 mM	0.95 uL	95°C	1 minuto
DNTP's	2 mM	1.25 uL	58°C	1:30 minutos
A25 f	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	1:30 minutos
A25 r	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	5 minutos
Taq polimerasa invitrogen		0.125 uL	8°C	infinito
Total mix		15.075 uL		
ADN muestra		1 uL		

D1:

Reactivos	Concentración	Volumen x1	Ciclado	
H2O	Libre de nucleasas	10 uL	Temperatura	Tiempo
Buffer	10x Invitrogen	1.5 uL	95°C	6 minutos
MgCl2	50 mM	0.95 uL	95°C	1 minuto
DNTP's	2 mM	1.25 uL	57°C	1:30 minutos
A25 f	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	1:30 minutos
A25 r	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	5 minutos
Taq polimerasa invitrogen		0.125 uL	8°C	infinito
Total mix		15.075 uL		
ADN muestra		1 uL		

PV92:

Reactivos	Concentración	Volumen x1	Ciclado	
H2O	Libre de nucleasas	10 uL	Temperatura	Tiempo
Buffer	10x Invitrogen	1.5 uL	95°C	6 minutos
MgCl2	50 mM	0.95 uL	95°C	1 minuto
DNTP's	2 mM	1.25 uL	58°C	1:30 minutos
A25 f	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	1:30 minutos
A25 r	Diluido 1:5	0.625 uL	72°C	5 minutos
Taq polimerasa invitrogen		0.125 uL	8°C	infinito
Total mix		15.075 uL		
ADN muestra		1 uL		

Anexo V: Genotipos obtenidos:

Muestras Tacuarembó	A25	ACE	B65	D1	PV92	Muestras Salto	A25	ACE	B65	D1	PV92
318	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS1	I/D	D/D	D/D	D/D	D/D
319	D/D	D/D	NA	D/D	D/D	AS2	I/D	I/I	I/D	D/D	D/D
320	D/D	D/D	D/D	NA	I/D	AS3	I/D	D/D	I/D	D/D	D/D
321	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS4	I/D	I/I	I/D	D/D	D/D
322	D/D	D/D	D/D	D/D	I/D	AS5	I/D	D/D	I/D	D/D	D/D
323	D/D	D/D	D/D	D/D	DD	AS6	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D
324	D/D	I/I	D/D	D/D	I/D	AS7	I/D	D/D	I/I	D/D	D/D
325	D/D	I/I	D/D	D/D	I/D	AS8	D/D	D/D	I/D	D/D	D/D
326	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS9	D/D	I/I	I/D	D/D	D/D
327	D/D	D/D	D/D	D/D	I/D	AS10	I/I	D/D	I/D	D/D	D/D

328	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D	AS11	I/D	D/D	I/D	I/I	D/D
329	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D	AS12	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D
331	D/D	D/D	I/I	D/D	I/D	AS13	D/D	D/D	I/D	D/D	I/I
332	D/D	D/D	I/D	D/D	I/D	AS14	I/D	D/D	I/I	D/D	D/D
333	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS15	NA	I/D	I/D	NA	D/D
334	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D	AS16	I/D	I/D	I/D	D/D	D/D
335	D/D	D/D	D/D	D/D	NA	AS17	I/D	D/D	I/I	D/D	I/D
336	D/D	D/D	I/I	D/D	I/D	AS18	I/D	I/I	D/D	D/D	I/I
337	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D	AS19	D/D	D/D	I/D	D/D	NA
338	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D	AS20	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D
339	D/D	I/I	D/D	D/D	I/D	AS21	D/D	D/D	I/I	D/D	I/D
340	D/D	D/D	D/D	D/D	I/D	AS22	D/D	I/I	I/I	D/D	D/D
341	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS23	D/D	D/D	D/D	D/D	I/D
342	D/D	D/D	D/D	D/D	I/I	AS24	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D
343	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS25	D/D	D/D	I/D	D/D	D/D
344	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D	AS26	D/D	D/D	D/D	D/D	I/D
345	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS27	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D
346	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS28	I/D	D/D	D/D	D/D	D/D
347	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS29	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D
348	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D	AS30	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D
349	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS31	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D
350	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D	AS32	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D
351	D/D	I/I	NA	D/D	D/D	AS33	D/D	I/I	D/D	D/D	I/D
352	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS34	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D
354	D/D	NA	NA	D/D	D/D	AS35	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D
355	D/D	D/D	NA	NA	D/D	AS36	D/D	I/I	NA	D/D	NA
356	I/I	D/D	D/D	D/D	D/D	AS37	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D
357	D/D	I/D	D/D	D/D	D/D	AS38	D/D	I/D	D/D	D/D	D/D
358	D/D	I/I	D/D	D/D	D/D	AS39	D/D	I/D	D/D	D/D	D/D
359	D/D	NA	NA	NA	D/D	AS40	D/D	D/D	D/D	NA	D/D
360	NA	D/D	D/D	D/D	D/D	AS41	D/D	D/D	I/D	D/D	D/D
361	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS42	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D
362	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS43	D/D	I/I	D/D	D/D	NA
363	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS44	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D
364	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D	AS45	D/D	I/D	D/D	D/D	NA
365	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS46	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D
366	D/D	D/D	I/D	D/D	NA	AS47	D/D	D/D	I/I	D/D	D/D
367	D/D	I/D	D/D	D/D	NA	AS48	D/D	I/D	D/D	D/D	D/D
368	NA	I/D	I/I	D/D	D/D	AS49	D/D	I/D	D/D	NA	D/D
142	D/D	I/D	D/D	D/D	NA	AS50	D/D	I/D	D/D	D/D	D/D
146	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS51	D/D	D/D	NA	D/D	NA
147	D/D	D/D	D/D	D/D	D/D	AS52	D/D	D/D	NA	D/D	D/D
						AS53	D/D	I/I	NA	D/D	D/D