



Universidad de Chile  
Facultad de Cs. Sociales  
Carrera Antropología Física  
Departamento de Antropología

# SEÑALES DE ADAPTACIÓN HUMANA AL HIDROARSENICISMO EN LOS VALLES ANDINOS DE LA REGIÓN DE ARICA Y PARÍACOTA: EVIDENCIAS DE VARIANTES PROTECTORAS DEL GEN ARSÉNICO [+3] METILTRANSFERASA

Memoria para optar al título de Antropólogo Físico

Autor: **Mario Andrés Apata M.**

Profesor Guía: Dr. Mauricio Moraga V.

Universidad de Chile

Santiago-Chile  
2015

*Esta memoria esta  
dedicada a mis abuelos,  
Juan y Lina, quienes me  
enseñaron sobre el esfuerzo  
y la humildad.*

## Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a los habitantes de Quebrada Camarones y del Valle de Azapa. Por su confianza, excelente disposición y buenos deseos con este trabajo. De no ser por ustedes, esta memoria no sería posible en lo absoluto.

Al Dr. Mauricio Moraga, por el apoyo a la realización de esta memoria. Por su paciencia, consejos y constante humor. Agradezco, de forma especial, su permanente motivación a mi desarrollo como profesional y persona.

Al Dr. Bernardo Arriaza, por incentivar la idea de esta memoria. Agradezco, de forma especial su acogida en Arica, así como sus consejos, motivación científica y apoyo.

Al Laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución Humana (Facultad de Medicina), agradezco su buena acogida, insaciable humor e incondicional apoyo.

A los funcionarios de la Facultad de Ciencias Sociales, les agradezco su buena disposición y solución a mis necesidades de estudiante. En especial, agradezco a todos mis profesores del Pregrado de la Universidad de Chile, por sus importantes conocimientos, y por fomentar la crítica y reflexión acerca de la diversidad de las sociedades humanas.

A mis amigos de antaño y a los nuevos, por su importante contribución en cuanto a sus consejos, correcciones y ayuda permanente, no sólo remitida a esta memoria sino también a mi vida de estudiante.

Finalmente, agradezco a mis padres, por su apoyo en esta memoria y por la temprana motivación a la ciencia. A mi padre, por enseñarme desde muy pequeño su trabajo en el laboratorio y por nuestras constantes visitas a la biblioteca en busca de libros sobre dinosaurios, animales e historia. A mi madre por enseñarme la disciplina y el esfuerzo del trabajo, y a toda mi familia por entender mi ausencia y su incondicional apoyo.

## Índice de Contenidos

Títulos	Páginas
Resumen .....	6
1. Introducción.....	7
2. Antecedentes .....	9
2.1 Hidroarsenicismo en la Región de Arica y Parinacota.....	9
2.2 Eficiente Metabolización del Arsénico .....	15
2.3 Evidencias Genéticas Asociadas a Eficiente Metabolización.....	19
3. Problema de Investigación.....	23
4. Hipótesis .....	27
5. Objetivos.....	27
6. Material y Método.....	28
6.1 Diseño de Estudio .....	28
6.1.1 Poblaciones y Muestras .....	30
6.1.2 Estimación de las Muestras .....	30
6.1.3 Consentimiento Informado .....	31
6.1.4 Recolección de las Muestras .....	32
6.1.5 Trabajo en Laboratorio .....	33
6.2 Metodología .....	33
6.2.1 Encuesta y Caracterización Poblacional .....	33
6.2.2 Estructura Genética de Camarones y Azapa.....	35
6.2.3 Método de Genotipificación PCR-RFLP .....	36
6.2.4 Métodos con Enfoque Genético Poblacional.....	39
6.2.5 Relación entre Variables de la Encuesta y Genotipos.....	42
6.2.6 Contrastación de Hipótesis .....	42
7. Resultados .....	44
7.1 Muestra .....	43
7.2 Caracterización Poblacional.....	44
7.1.1 Encuesta .....	44
7.1.2 Estructura Genética Poblacional (ADNmt y Crom-Y).....	49
7.2 Genotipificación.....	52
7.2.1 Frecuencias Genotípicas.....	52

7.2.2 Frecuencias Génicas.....	54
7.2.3 Diferencias Genotípicas y Génicas .....	54
7.3 Análisis Genético-Poblacional .....	56
7.3.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	56
7.3.2 Estimación de Haplotipos.....	57
7.3.4 Diferenciación poblacional (Fst).....	58
7.3.5 Comparación Inter-Poblacional .....	59
7.4 Asociación de Encuesta y Genotipos.....	74
7.4 Prueba de Hipótesis .....	75
8. Discusión.....	76
8.1 Adaptación Humana al Hidroarsenicismo.....	76
8.2 Interacción entre Poblaciones Humanas y Arsénico .....	78
8.8 Estructura Genética de las poblaciones de Camarones y Azapa.....	80
9. Conclusión .....	82
10. Bibliografía.....	83
11. Anexos .....	91

## **Resumen**

Millones de personas en el mundo se intoxican al beber agua con altas concentraciones de arsénico. En el norte de Chile, ríos de la región de Arica y Parinacota poseen altos niveles de arsénico, siendo la población de Quebrada Camarones la de mayor exposición ( $>1000 \mu\text{g/L}$ ). Sin embargo, esta población ha subsistido en dicho ambiente adverso durante los últimos 9000 años A.P., y recientemente no ha presentado emergencias epidemiológicas asociadas. Por este motivo, el presente trabajo busca evaluar cuatro polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) del gen AS3MT que poseen "variantes protectoras" asociadas a una alta capacidad metabolizadora del arsénico. Las poblaciones en estudio fueron del valle de Camarones ( $n=51$ ) y del valle de Azapa ( $n=51$ ), elegido éste último por su menor exposición ( $10\text{-}20 \mu\text{g/L}$ ). Las muestras fueron caracterizadas mediante genotipificación por PCR-RFLP. Los resultados mostraron mayores frecuencias de las variantes protectoras en Camarones (SNP12390, C=66%; SNP14215, T=69%; SNP14458, T=99%; SNP35991, A=72%) que en Azapa, pero las diferencias no son significativas para cada SNP. Por otra parte, la estimación de haplotipos mostró que la combinación de variantes protectoras CTTA es la más frecuente en poblaciones expuestas del norte, alcanzando un 64% en Camarones y un 48% en Azapa. En conclusión, observamos una alta frecuencia de variantes protectoras en esta zona, principalmente en la población de Camarones, sugiriendo que ambas poblaciones poseen una alta capacidad metabolizadora del arsénico. Estos resultados, pretenden aportar una integración de evidencias biológicas y culturales que contribuyan a comprender la adaptación humana a ambientes extremos.

## 1. Introducción

El arsénico es un reconocido contaminante ambiental que tiene peligrosos efectos sobre la salud de las personas. Entre sus efectos patológicos más comunes esta la hiperqueratosis e hiperpigmentación de la piel. Sin embargo, cuando la exposición es crónica, puede provocar un considerable aumento en la incidencia del cáncer al hígado, riñones y pulmones (Bundschuh et al., 2012). Además, en mujeres embarazadas puede provocar una alta mortalidad infantil, debido al aumento de abortos espontáneos, muertes fetales y de recién nacidos (Hopenhayn-Rich et al., 2000; Hopenhayn et al., 2003).

Actualmente, varias poblaciones en el mundo poseen una alta exposición, debido al consumo de aguas con altas concentraciones de arsénico inorgánico (iAs). Las altas concentraciones de iAs se deben principalmente a procesos geogénicos como las erupciones volcánicas y los movimientos tectónicos que conforman el relieve terrestre. Por estos motivos, ríos y canales subterráneos que tienen un origen volcánico-cordillerano presentan altos niveles de arsénico. Por lo tanto, no es de extrañar que las poblaciones más afectadas sean las que comparten el cinturón de fuego del Pacífico (Bundschuh et al. 2012), es decir, las de países como India, Taiwán, Bangladesh y Vietnam para el sudeste asiático, así como las del borde oeste de América (Estados Unidos, México, Chile y Argentina).

En países como Chile y Argentina, las poblaciones han estado históricamente expuestas al arsénico, debido a que sus principales fuentes hídricas tienen un origen común en la cordillera de los Andes, donde las concentraciones superan ampliamente la norma mundial de 10 µg/L (OMS, 2006), alcanzando valores sobre los

300  $\mu\text{g/L}$ , límite mínimo desde donde ya se han visto patologías asociadas al hidroarsenicismo (Pierce et al., 2012; Hughes et al., 2011). En este sentido, un caso ilustrativo fue el ocurrido en Antofagasta (II región, Chile), donde los niveles de exposición fueron de 90  $\mu\text{g/L}$  hasta 1950, y de 860  $\mu\text{g/L}$  entre los años 1958 y 1970. Tan abrupto aumento en la exposición, se debió a la utilización de las aguas del río Toconce (800  $\mu\text{g/L}$ ) como la principal fuente hídrica de la creciente ciudad. Este hecho, provocó un aumento de la mortalidad infantil en un 18-24% entre 1958 y 1965. Además, aumentó considerablemente la mortalidad por cáncer al hígado, riñones y pulmones entre 1985 y 1992 (Ferrecio & Sancha, 2006).

Por otra parte, son de especial atención las poblaciones ancestrales del altiplano andino, quienes han estado milenariamente expuestas a las altas concentraciones de arsénico en el agua. Esto ha promovido que recientes investigaciones consideren el origen cultural y/o biológico como un rasgo de variabilidad o bien de adaptación al hidroarsenicismo. En este sentido, estudios genómicos llevados a cabo en el altiplano argentino, han puesto en evidencia la posible resistencia de sus habitantes (principalmente atacameños) al arsénico. En Chile, mientras tanto, son las localidades de Quebrada Camarones (XV región), las que poseen la mayor exposición al arsénico (>1000  $\mu\text{g/L}$ ).

En síntesis, sumado a los recientes descubrimientos en el gen codificante de la enzima Arsénico (+3) metiltransferasa (AS3MT), que mostró estar asociada con diferencias inter-poblacionales de eficiente metabolización del arsénico, es que nos hemos propuesto caracterizar genéticamente las poblaciones más expuestas de las localidades de la XV región, mediante la caracterización de cuatro polimorfismos del gen AS3MT descritos en la literatura como marcadores de eficiente metabolización.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Hidroarsenicismo en la Región de Arica y Parinacota

Esta región se caracteriza por poseer aguas de ríos, manantiales y pozos con altos niveles de arsénico inorgánico (Figuroa L., 2001; Cornejo-Ponce et al., 2011). Dichos niveles se deben principalmente a que los ríos y canales subterráneos poseen un origen común en la cordillera de los Andes, donde los procesos geológicos (p.ej. vulcanismo y movimientos tectónicos) contribuyen a la contaminación de las aguas (López et al., 2012). Las concentraciones de arsénico en ríos de la región se distribuyen entre valores cercanos a los 10 y 200 µg/L, siendo el río de Camarones donde los valores superan los 1000 µg/L (Figura 1).

En cuanto a las principales evidencias de hidroarsenicismo, llama la atención que éstas provienen principalmente desde la prehistoria, ya que se ha podido establecer que desde el Arcaico Temprano (8550-5000 a.C.<sup>1</sup>) las poblaciones estuvieron permanentemente expuestas al arsénico (Arriaza et al., 2010). Esta constante exposición, puede deberse a que los ambientes de valles interiores y quebradas fueron muy atractivos y fundamentales para la subsistencia de los primeros pobladores, dado que otorgaban una cantidad de recursos vitales para la vida en el desierto. Sin embargo, no había forma de que en tan temprano contexto se pudiera reconocer la peligrosidad de las aguas de ríos y manantiales contaminados con arsénico.

---

<sup>1</sup> Los periodos y fechas ocupados en este documento corresponden a la síntesis crono-cultural de Arriaza & Standen (2008).

Hace algunos años, se postuló una hipótesis que abrió el debate en torno a los efectos del arsénico sobre las poblaciones de la "cultura chinchorro" (Arriaza B.T., 2005a), ésta consiste en que la práctica cultural de momificación artificial, signo diagnóstico de esta cultura, emerge a partir de una respuesta emocional causada por la alta mortalidad de sus infantes perinatales y nonatos debido a los efectos tóxicos y teratógenos en mujeres embarazadas. Esta hipótesis se sustenta en los dos primeros sitios arqueológicos encontrados en Quebrada Camarones, Cam-14 y Cam-17, datados entre los 5050 a.C. y 4500 a.C., donde se observó que sólo niños y fetos fueron momificados artificialmente. Además, el autor relaciona la alta tasa de mortalidad infantil de los chinchorro estimada en un 21-23% (Arriaza B.T., 2005b), con poblaciones modernas expuestas, como por ejemplo las de Bangladesh y Chile (Antofagasta) donde las tasas estimadas fueron de un 20-24%, siendo las principales causas de muerte los abortos espontáneos y muertes fetales (Hopenhayn et al., 2003; Ferrecio & Sancha, 2006).

Por otra parte, se han evaluado los efectos del arsénico ambiental, principalmente el presente en el agua, sobre los grupos humanos prehispánicos de la XV región. Algunos resultados destacados, son la obtención de concentraciones de arsénico a partir de muestras de cabello en individuos momificados de forma artificial y natural, provenientes de contextos de entierros fúnebres desde los periodos del Arcaico (~9000-1500 a.C.) hasta el Formativo (1500 a.C.-500 d.C.).

Para las momias del Arcaico Temprano (8550-5000 a.C.) se encontraron valores promedios de 58,8 µg/g, para el Arcaico Medio (5000-3000 a.C.) de 20,05 µg/g, para sitios de la transición del Arcaico Tardío al Formativo (~3000 a.C.) fue de 37,8 µg/g, y por último para sitios Formativos (1500 a.C.-500 d.C.) se encontró una media de 6,9

$\mu\text{g/g}$  en momias exclusivamente naturales (Arriaza et al., 2010; Byrne et al., 2010). Es importante destacar que los valores vistos como estándar en muestras de cabello para individuos no expuestos, se ubican en un rango de 0.08-0,25  $\mu\text{g/g}$ , pero en aquellos que están expuestos al arsénico ambiental pueden superar fácilmente los 9  $\mu\text{g/g}$ , por lo que pueden ser considerados como individuos con alta susceptibilidad a los efectos tóxicos del arsénico (Hindmarsh J.T., 2002). Por lo tanto, se puede señalar que los chinchorros estuvieron ampliamente expuestos al arsénico ambiental durante el Arcaico (8550-1500 a.C.), y hacia el periodo Formativo (1500 a.C.-500 d.C.) sus rangos de arsénico inorgánico en el cabello fueron disminuyendo, lo que podría deberse a que su metabolización fue más eficiente. Además, esta disminución del arsénico en el Formativo, coincide con el inicio de una nueva forma de vida, que se caracteriza principalmente por una reestructuración de la organización social en torno a la agricultura. En particular, dentro del Formativo, se intensifican los asentamientos en ambientes de valles, y aumentan los cultivos de la papa, camote, ají y maíz. Estos cambios, traen consigo la introducción de nuevos nutrientes alimenticios, como por ejemplo el maíz y la quínoa, que pudieron contribuir a mejorar las condiciones de salud de los chinchorros. Además, su dieta fue complementada con los recursos marinos que continuaban extrayéndose, puesto que la tradición pesquera de los chinchorros permanecerá hasta tiempos más tardíos.

Estudios, que aportan a esta última idea, son los de Silva y Cols. (2010a) quienes evaluaron el posible efecto teratógeno del arsénico sobre el desarrollo embrionario del sacro, donde mostraron que existen diferencias significativas entre la frecuencia de espina bífida presente en momias naturales de Quebrada Camarones que tuvieron un 13,51% ( $n=5/37$ ; sitios de Cam-8 y Cam-9), con las de Azapa y Lluta que tuvieron un 2,4% ( $n=2/83$ ; sitios de Az-140 y Lluta-54) durante la transición del

periodo Medio (700 a.C.- 1100) al Tardío (1470 a.C.-1530 d.C.). Tal diferencia refleja en parte, que el origen foráneo (Inka) de los individuos de Cam-9 contribuye a una mayor frecuencia de la espina bífida. Mientras que en la población local de los valles de Azapa y Lluta, la introducción de alimentos ricos en ácido fólico (también conocido como Vitamina B9) en la dieta, pudo contribuir a una disminución en los abortos, puesto se ha demostrado que dicha vitamina es fundamental para prevenir deformaciones en la placenta, anencefalia y espina bífida (Silva et al., 2010b). Por el contrario, la deficiencia de ácido fólico, es uno de los factores de riesgo más importantes para los efectos tóxicos del hidroarsenicismo crónico en un individuo.

En la actualidad, la población de Arica y Parinacota, y particularmente la de Quebrada Camarones, no ha presentado emergencias epidemiológicas a causa de las patologías asociadas al hidroarsenicismo crónico. En general, se puede observar que las tasas de mortalidad<sup>2</sup> de la región son levemente mayor que la tasa nacional entre los años 2000 y 2010 (DEISS-MINSAL, 2010c). Además, las principales causas de muerte para la región son las de tipo tumores (neoplasias), circulatorias e infecciosas. Por otro lado, no se han realizado estudios que abarquen problemas como la hiperqueratosis o hiperpigmentación de la piel en habitantes de esta zona, como si es reconocido en otras poblaciones del Sudeste Asiático (Hsu et al., 2013). En cuanto a las tasas de mortalidad de infantes perinatales y nonatos, las medias son inferiores a las nacionales (DEIS-MINSAL, 2010a), y se tiene como principal causa de muerte las enfermedades infecciosas y parasitarias (DEIS-MINSAL, 2010b). Mientras que en la Comuna de Camarones, las tasas de mortalidad infantil son de cero (DEIS-MINSAL, 2010a).

---

<sup>2</sup> Las tasas de mortalidad (por mil habitantes) correspondientes al año 2009, muestran un valor de 5.7 para la Región de Arica y Parinacota, y de 5.4 para la nación (Chile) (INE, 2012b). En cuanto a las defunciones y las principales causas de muerte, en la XV región corresponde a Tumores (neoplasias) que para el año 2010, tuvo 254 defunciones de un total de 1135 (DEIS-MINSAL, 2010b). Las enfermedades que siguen con mayor incidencia y causa de muerte, son las de tipo circulatorias e infecciosas (DEIS-MINSAL, 2010). El anterior patrón, también puede ser observado entre los años 2000-2010 (DEIS-MINSAL, 2010c).

Por lo tanto, la suma de las evidencias arqueológicas y actuales para la región, y particularmente para Quebrada Camarones, permiten dar indicios de una posible adaptación o resistencia a los efectos nocivos del Hidroarsenicismo. En este sentido, la posibilidad de una adaptación al arsénico podría haber contribuido a la subsistencia de la población de Camarones en ese ambiente altamente tóxico. Por lo tanto, y dado que los niveles de exposición al arsénico en las aguas ha sido constante (Figueroa L., 2001), es que tiene sentido proponer un aumento en la eficiencia de la metabolización del arsénico en esta población, tal como ha sido evidenciado en otras poblaciones del mundo (Agusa et al., 2011), y en especial dentro de la zona andina (Engström et al., 2007; 2011; 2013; Schlebusch et al., 2013).

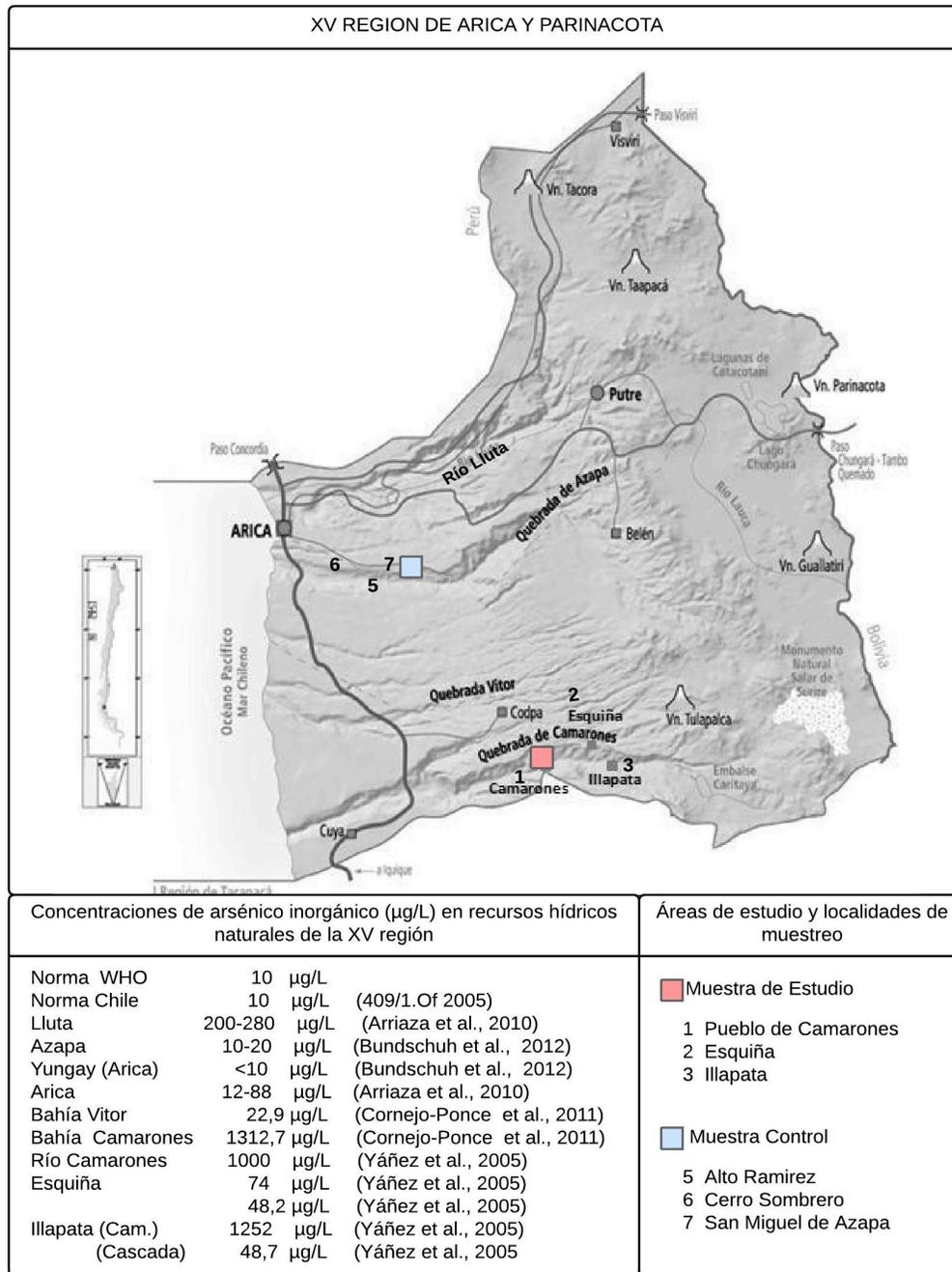


Figura 1. Concentraciones de arsénico en ríos y quebradas de la región de Arica y Parinacota.

## 2.2 Eficiente Metabolización del Arsénico en Poblaciones Humanas

El ser humano al igual que otros organismos posee mecanismos que le permiten eliminar elementos nocivos de su cuerpo. En este sentido, el principal proceso de eliminación del arsénico, es su metabolización o biotransformación en compuestos orgánicos. Este proceso se desarrolla principalmente en el sistema hepático, donde se metaboliza cerca de un 60% del arsénico ingerido. La vía de metabolización se caracteriza por reacciones de reducción y metilación del arsénico inorgánico (iAs), sin embargo debe destacarse que en este proceso puede ocurrir una única metilación o bien una segunda metilación para un mismo compuesto. La enzima Arsénico (+3) metiltransferasa o AS3MT, es la que cataliza el proceso de metilación en los compuestos inorgánicos y del monometilarsénico. En consecuencia, por acción de esta enzima, los compuestos de iAs son transformados en productos orgánicos (metabolitos), los que luego serán excretados en la orina como monometilarsénico (MMA) o dimetilarsénico (DMA), de acuerdo al número de metilaciones recibidas. Finalmente, se ha establecido de manera estándar para un individuo sano, que del total de arsénico excretado en la orina, el 10-30% corresponde a iAs, el 10%-20% a MMA ( $\text{MMA}^{\text{III}} + \text{MMA}^{\text{V}}$ ), y 60-80% a DMA ( $\text{DMA}^{\text{III}} + \text{DMA}^{\text{V}}$ ) (Vahter et al., 1999; Thomas et al., 2007).

No obstante, aún existe discusión en torno a la vía de metabolización. Por esta razón, se han propuesto dos hipótesis diferenciadas según el tipo de metilación, primero una de tipo oxidativa o clásica, y otra de tipo reductora (**Figura 2**). La vía clásica se basa en reacciones de reducción y metilación oxidativa, donde los metabolitos que serán excretados en la orina son compuestos de monometilarsénico

y dimetilarsénico trivalentes. Mientras que, en la vía reductora ocurren reacciones de reducción y metilación reductora, donde los compuestos inorgánicos previos a ser metilados conformaran complejos con glutatión, para finalmente ser eliminados como monometilarsénico y dimemetilarsénico pentavalentes. Conforme a nuevas evidencias en torno a los niveles de toxicidad de los compuestos de arsénico, es que se ha podido concluir que los de tipo trivalente son más tóxicos, y específicamente que el monometilarsénico trivalente ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ) es el más citotóxico y genotóxico para los seres humanos (Mass et al., 2001), es decir, mucho más que los compuestos inorgánicos (trivalentes y pentavalentes). De acuerdo a dichas evidencias, la vía reductora adquirió mayor fuerza, puesto que los metabolitos excretados allí son de tipo pentavalentes ( $\text{MMA}^{\text{V}}$  y  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ), es decir, son compuestos de arsénico con la menor toxicidad. En este sentido, los porcentajes de productos metilados pentavalentes presentes en la orina permiten definir patrones de eficiente metabolización (% de iAs; % de  $\text{MMA}^{\text{V}}$ ; % de  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ; así como proporciones de  $\text{MMA}^{\text{V}}$ /iAs y  $\text{DMA}^{\text{V}}$ / $\text{MMA}^{\text{V}}$ ), siendo los valores de  $\text{MMA}^{\text{V}}$  y  $\text{DMA}^{\text{V}}$  los más importantes para el diagnostico de una eficiente primera o segunda metilación, respectivamente (Hughes et al., 2011; Agusa et al., 2011).

Bajo los parámetros de una eficiente metabolización, se ha podido distinguir diferencias inter-poblacionales, por ejemplo taiwaneses expuestos a 1300  $\mu\text{g/L}$  de iAs en el agua, excretan altos porcentajes de  $\text{MMA}^{\text{V}}$  (con media de 30%), mientras que en América, adultos en Nevada (E.E.U.U.) también con una alta exposición de 1300  $\mu\text{g/L}$  de arsénico, excretan en promedio un 23% de  $\text{MMA}^{\text{V}}$  (Warner et al., 1994). En América Latina, la población del valle de Yaqui (México), donde la exposición es de 43.3  $\mu\text{g/L}$  de As en el agua, mostró valores de 7.5-9.7% de  $\text{MMA}^{\text{V}}$  en la orina (Meza et al., 2004). Sin embargo, es la población andina de Argentina (principalmente

atacameños), expuesta a concentraciones de 300 µg/L, quienes excretan los valores mínimos de MMA<sup>V</sup> (2.1-3.6%) (Tseng C.H., 2009). De manera general, también se ha podido observar que la capacidad de primera metilación (MMA<sup>V</sup>) es mayor en individuos chilenos respecto de mexicanos y taiwaneses (Hernández et al., 2008a; 2008b; Meza et al., 2004).

Otras variables como la edad, el sexo, el origen étnico, los niveles y el tiempo de exposición de una población también han mostrado estar asociadas con cambios en la capacidad metabolizadora (Tseng C.H., 2009). Es más, en recientes estudios se ha puesto en evidencia que algunas variaciones genéticas de la AS3MT, están mucho más asociadas con diferencias inter-poblacionales en los patrones de eficiente metabolización (Agusa et al., 2011).

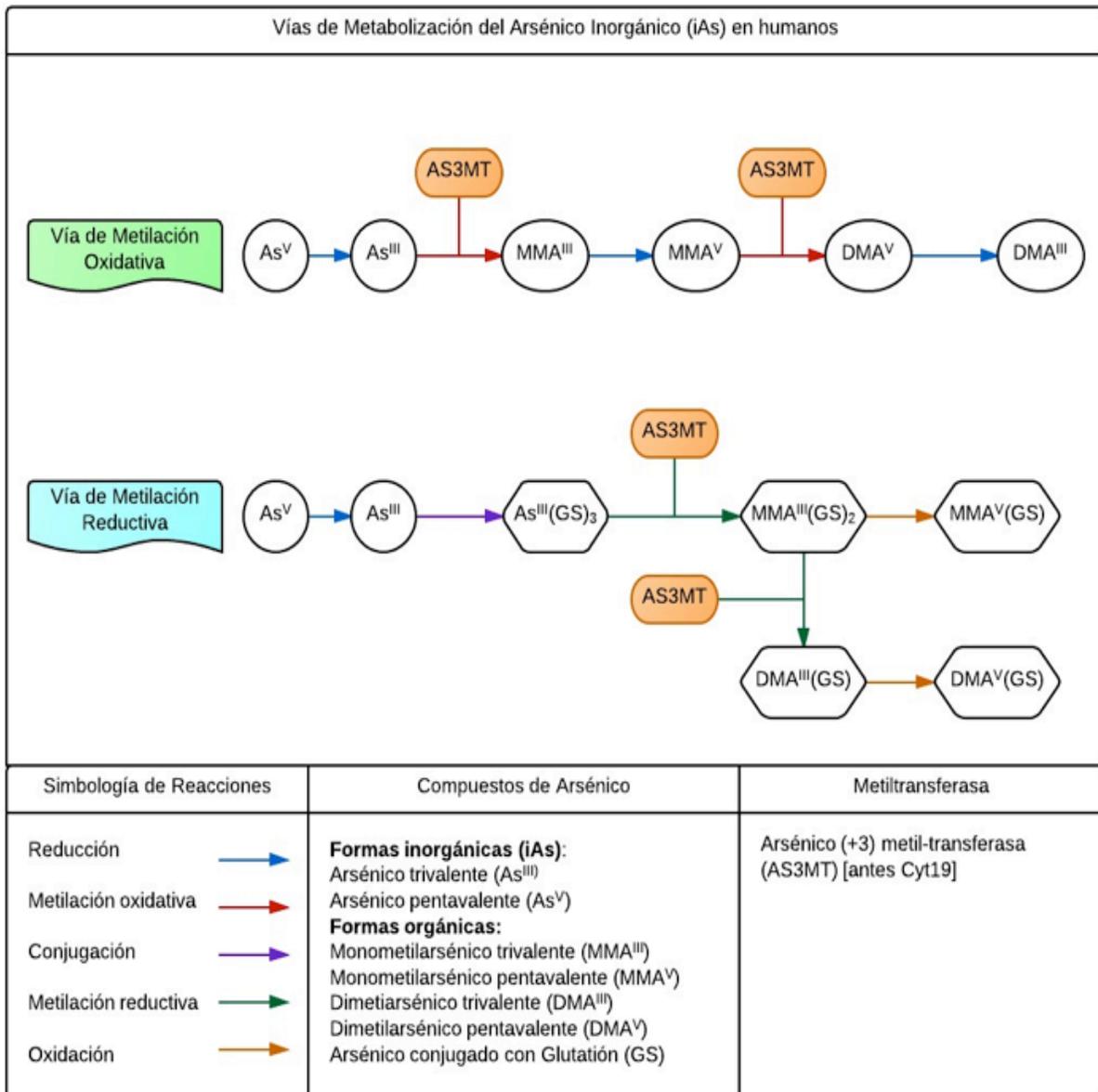


Figura 2. Vías de metabolización del arsénico

## 2.3 Polimorfismos del Gen AS3MT Asociados a una Eficiente Metabolización del Arsénico

Dado el marco anterior, es que se ha propuesto a la arsenito (+3) metiltransferasa (AS3MT) como una de las principales contribuyentes a la variación inter-individual y poblacional en los patrones de eficiente metabolización. La AS3MT es una enzima que cataliza la metilación de los compuestos de arsénico trivalentes ( $As^{III}$  y  $MMA^{III}$ ), a partir de la entrega de un grupo metilo ( $-CH_3$ ) desde un sustrato conocido como S-Adenosil-L-metionina (SAM) presente en el hígado (Lin et al., 2002).

Dentro del gen codificante de la AS3MT, existen cuatro polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) fuertemente asociados con patrones de eficiente metabolización. El primero, corresponde al SNP ID 14458 (rs11191439). Dicho SNP consiste en una transición  $T \rightarrow C$  y produce un cambio de aminoácidos desde una Metionina (Met) a una Treonina (Thr) en la posición 284 del exón 9. Dada su ubicación en una región codificante de la proteína los cambios en éste pueden afectar directamente la función enzimática de la AS3MT. El SNP 14458 ha sido asociado con un patrón de primera metabolización, es decir, con mayores porcentajes de MMA.

Un estudio en 50 trabajadores chilenos, todos de sexo masculino, sin ascendencia étnica descrita, expuestos a iAs en suspensión ( $>50$  ppm), durante 15 años en una planta de fundición (Chuquicamata, II región de Chile), permitió demostrar que los portadores de los genotipos TC y CC del SNP 14458 excretaban un promedio de 25% de MMA en la orina. Dicho resultado, significó un aumento del 8,63% de MMA en la orina respecto de los portadores de la forma homocigota ancestral TT (12% de MMA) ( $P=0,0004$ ) (Hernández et al., 2008a). No obstante, para

corroborar dicha asociación, Hernández y Col. (2008b) aumentaron el tamaño de la muestra a 207 trabajadores, y el resultado siguiente confirmó que el polimorfismo Met<sup>287</sup>Thr (SNP 14458) tiene influencia sobre el metabolismo en esta población. Es decir, los portadores de la variante C (<sup>287</sup>Thr) tuvieron una eficiente primera metilación, excretando 4,63% más de MMA en la orina ( $p= 0,0007$ ), y presentando 2,98 veces más altos niveles de MMA, ajustado a la edad de exposición sobre el estándar ( $p= 0,011$ ), que los participantes homocigotos TT. Estos estudios coincidieron con similares resultados para poblaciones de europeos (Liendberg et al., 2007) y mexicanos (Meza et al., 2007; Gómez-Rubio et al., 2012). Por el contrario, se ha visto que en poblaciones asiáticas, los portadores del alelo C para este SNP presentan patrones de metabolización muy cercano a los valores estándar de MMA, es decir, de 10 - 20% (Fujihara et al., 2007; 2010).

En cuanto a las frecuencias alélicas para el SNP 14458, se ha visto que el alelo C mostró tener importantes diferencias entre algunas poblaciones, por ejemplo en asiáticos (japoneses, mongoles, chinos, tibetanos, tamiles y singaleses) se obtuvo un rango de 1 a 2%, mientras que en las poblaciones americanas los valores fueron cercanos al 10% en americanos caucásicos y afroamericanos, y de un 14% en chilenos. Además, la frecuencia en africanos fue de un 16.5% en promedio (Ovambos y Xhosas), y de un 10% en europeos. En cuanto a las frecuencias del alelo T para este SNP, no se describieron importantes diferencias<sup>3</sup> (Fujihara et al., 2007; 2008).

Por otra parte, existen tres SNPs identificados como ID 12390 (rs3740393, C/G), 14215 (rs3740390, C/T) y 35991 (rs10748835, A/G), ubicados en regiones intrónicas del

---

<sup>3</sup> Las frecuencia para portadores del alelo T fueron entre un 96 a 100% en poblaciones asiáticas (japoneses, mongoles, chinos, tibetanos, tamiles y singaleses), disminuyendo levemente en poblaciones americanas hasta un 90% en americanos caucásicos, 89% en afro-americanos, y 86% en chilenos. Mientras que en poblaciones de Europa central y de África (Ovambo y Xhosas) el alelo T mostró tener una frecuencia del 89%.

gen AS3MT (Engström et al., 2007). Estos SNPs fueron estudiados en una población local de la altiplanicie andina argentina (San Antonio de los Cobres), donde sus variantes C, T y A mostraron una fuerte asociación con patrones de segunda metabolización, es decir, con mayores porcentajes de DMA (Engström et al., 2011). Además, se estableció que dichas variantes poseían un fuerte ligamiento ( $r^2 > 0.5$ ). Posteriormente, se estableció que también conformaban un haplotipo conocido como C-T-A, denominado así en referencia a los portadores de los alelos C, T y A, respectivamente para los SNPs antes mencionados. Además, este haplotipo tuvo una mayor frecuencia en dicha población andina (68.7%), disminuyendo progresivamente en las poblaciones que presentaban menor exposición a aguas contaminadas con arsénico, como por ejemplo poblaciones nativo americanas de HGDP<sup>4</sup> (14.3%), peruanos (50.5%) y argentinos mestizos de la localidad de Salta (36.7%) (Schelebusch et al., 2013).

Los SNPs que conforman el haplotipo C-T-A fueron analizados en poblaciones asiáticas, donde se encontró que las frecuencias alélicas de dichos polimorfismos eran muy diferentes a las presentes en la población andina de Argentina. Por ejemplo, las frecuencias alélicas del SNP 12390 en poblaciones asiáticas fueron mayores para los portadores del alelo G con 50 a 80%, mientras que para el alelo C del mismo SNP, fue tan solo del 20-40%. Dichas frecuencias se contrastan con las obtenidas para atacameños argentinos, que poseen mayor frecuencia alélica de C (72%) para ese SNP (Engström et al., 2007). Este patrón, de mayores frecuencias de alelos no asociados con eficiente metabolización, se mantuvo entre los SNPs 14215 y 35991 para las poblaciones asiáticas (Fujihara et al., 2009; 2010).

---

<sup>4</sup> Human Genome Diversity Project (HGDP)

Por último, algunas revisiones de todos los polimorfismos del gen AS3MT asociados con patrones de eficiente metabolización, han mostrado tener similitudes en sus conclusiones respecto a los SNP 14458 (T/C) y 12390 (G/C), en donde ambos revelan que sus variantes C poseen una fuerte relación con los patrones de primera y segunda metilación, respectivamente (Agusa et al., 2011; Sumi y Himeno et al., 2012). Por lo tanto, podrían ser buenos candidatos para testear la actividad enzimática de manera indirecta. Por último, también ha sido evidenciado que dichas variantes son las que más contribuyen a la variación inter-poblacional y de susceptibilidad a los efectos tóxicos del arsénico (Tseng C.H., 2009).

En consecuencia, desde este punto proponemos a los alelos "C-T-A" vistos en las población de SAC en argentina y la variante ancestral "T" del SNP14458 como "variantes protectoras" del arsénico (Figura 3). Particularmente, consideraremos los genotipos que contengan las variantes protectoras SNP12390, 14215 y 35991 como genotipos protectores. Mientras que en el SNP14458, sólo podemos considerar al genotipo TT como protector, pues la presencia del alelo C favorece la primera metilación (un aumento de MMA) y con ello mayor riesgo de efectos tóxicos, a su vez conlleva un cambio de aminoácidos que ha sido fuertemente asociado con efectos tóxicos del arsénico, principalmente con rasgos de lesiones a la piel y efectos genotóxicos (Hernández et al. 2014).

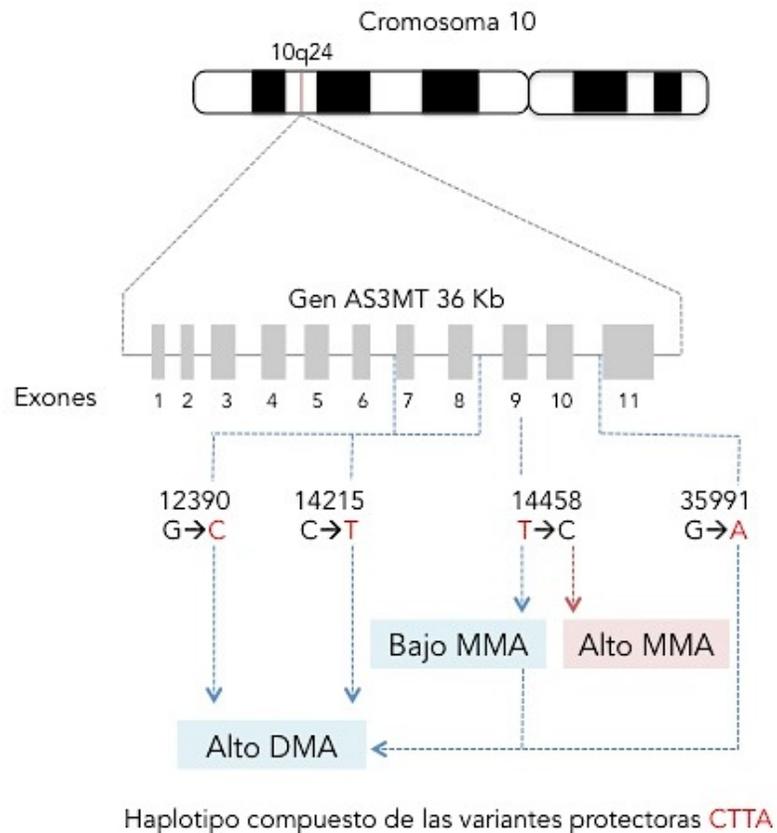


Figura 3. Variantes protectoras del gen AS3MT

### 3. Problema de Investigación

Los ambientes de la XV región son altamente tóxicos por arsénico, y particularmente es Quebrada Camarones donde se encuentran los mayores niveles de exposición para la población humana (>1000 µg/L). Dichos ambientes se caracterizan por poseer nichos ecológicos que varían de acuerdo a su altitud, distinguiéndose en nichos de costa, valle y altiplano. Tales nichos habrían sido fundamentales para los primeros grupos humanos que habitaron esta zona, debido a que ofrecen una diversidad de recursos alimenticios y una disponibilidad de agua

esencial para la subsistencia en las extremas condiciones del desierto de Atacama (clima desértico y escasas precipitaciones).

Las interacción entre las poblaciones humanas y los ambientes extremos en esta zona (clima desértico, altitud y altos niveles de arsénico), han sido puestas en evidencia desde contextos tempranos (~9000 a.C.) hasta la actualidad (Schull & Rothhammer, 1990; Arriaza et al., 2010; Santoro et al., 2012). Respecto a la exposición al arsénico en el agua bebible, se debe señalar que esta ha sido permanente y que fueron los grupos costeros del Arcaico Temprano quienes manifestaron los primeros signos de toxicidad, caracterizados principalmente por una alta mortalidad infantil (Arriaza B.T., 2005b), y por afecciones a la piel y órganos internos (Figueroa L., 2001). Sin embargo, en la actualidad los habitantes de esta zona, y en especial los de Quebrada Camarones, no han presentado signos patológicos diagnósticos de hidroarsenicismo. Tal fenómeno, podría deberse a un aumento en la eficiencia de la metabolización del arsénico en estas poblaciones.

Una aproximación al aumento de la eficiencia metabolizadora del arsénico en poblaciones de esta zona, puede ser evidenciada mediante las concentraciones de iAs y metabolitos extraídas desde cabellos de momias chinchorros e individuos locales de la quebrada en la actualidad (Bartkus et al., 2011; Arriaza et al., 2010; Byrne et al., 2010; Yáñez et al., 2005). Como se señaló en los antecedentes, para un individuo sano o expuesto a mínimas concentraciones (<10 µg/L), el rango de iAs en pelo es de 0.08-0.24 µg/g, mientras que individuos altamente expuestos puede superar fácilmente los 9 µg/g. En los chinchorros se obtuvieron valores promedio de 58.8 µg/g para el periodo del Arcaico Temprano y de 6.9 µg/g para el periodo Formativo. En habitantes actuales de las localidades de quebrada Camarones, se

obtuvieron promedios de 0.26  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{As}^{\text{III}}$ ; 0,15  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{As}^{\text{V}}$ ; 0,02  $\mu\text{g/g}$  para MMA en individuos de la localidad de Esquiña (122  $\mu\text{g/L}$  de iAs en sus aguas). En la localidad de Illapata (con 1000  $\mu\text{g/L}$  en sus aguas), los habitantes poseen valores promedios de 3,75  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{As}^{\text{III}}$  y 0,45  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{As}^{\text{V}}$ ; y sus valores de metabolitos son de 0,04  $\mu\text{g/g}$  para MMA y 0,16  $\mu\text{g/g}$  de DMA (Yáñez et al., 2005). De acuerdo a estos valores, se puede señalar que los habitantes de Camarones han disminuido sus niveles de iAs en el cabello desde la prehistoria (58.8  $\mu\text{g/g}$  a 6.9  $\mu\text{g/g}$  de iAs) hasta la actualidad (0.15-3.75  $\mu\text{g/g}$  de iAs), lo que podría deberse a que las especies inorgánicas del arsénico se han reducido a causa de un aumento en la eficiencia de su metabolización.

Por otro lado, se ha demostrado que existen factores de riesgo que contribuyen a la variación inter-poblacional y de susceptibilidad a los efectos tóxicos del arsénico sobre la salud (Tseng C.H., 2009; McClintock et al., 2010). Los factores que muestran mayor variabilidad, son polimorfismos del gen AS3MT, el origen étnico, el sexo, la edad, la contaminación por actividades laborales (minería; agricultura; pesticidas, etc.), el tiempo y los niveles de exposición. En esta zona, gran parte de la población presenta una cierta homogeneidad en varios de estos factores, como por ejemplo los que se relacionan con dimensiones socioeconómicas, culturales y biológicas. En lo socioeconómico, son una población exclusivamente rural, con una economía principalmente agropecuaria. Respecto a su origen étnico, un 63% se define como Aymaras (INE, 2002a). Y por último, a nivel biológico, se puede extrapolar a partir de algunos estudios realizados con muestras provenientes de esta zona (Camarones, Esquiña e Illapata), que existe una mayor frecuencia del haplotipo B del ADN mitocondrial, lo que nos muestra que existe un común linaje materno amerindio, concordante con una distribución filogeográfica más amplia de

individuos de etnia Aymara chilenos (Moraga et al., 2006; Rothhammer et al. 2010; de Saint Pierre et al. 2012). Es importante mencionar, que los factores de riesgo que mayormente contribuyen a la variabilidad inter-poblacional, como son las variantes protectoras del gen AS3MT, el origen étnico, el tiempo y los niveles de exposición al arsénico (Tseng C.H., 2009) no han sido estudiados en la población de Camarones, por lo que sería importante considerarlos y caracterizarlos, de manera de poder conocer posibles relaciones entre ellos, dado el contexto tóxico descrito anteriormente para dicha población.

Bajo esta idea, y dada la dificultad de los análisis químicos en la obtención de metabolitos (Cornejo-Ponce et al., 2011; Yáñez et al., 2005), así como la ausencia de estudios que hayan buscado evaluar polimorfismos asociados a una eficiente metabolización del arsénico en la zona, es que se propone aportar evidencias genéticas que contribuyan a comprender la variabilidad interindividual y poblacional entre los habitantes expuestos al arsénico en Quebrada Camarones. Esto se llevará cabo mediante marcadores genéticos (SNPs) que poseen "variantes protectoras" fuertemente asociadas con patrones de eficiente metabolización, como serían el SNP 14458 (Met<sup>287</sup>Thr) y los tres SNPs que conforman el haplotipo C-T-A. La presencia de dichas "variantes protectoras" podrían indicar que poblaciones con mayor exposición al arsénico (p. Ej. Camarones) tienen mayor frecuencia de estas variantes genéticas que otras poblaciones expuestas en la región (p. Ej. Lluta y Azapa). Finalmente, se establece como pregunta de investigación si:

*¿Existe una asociación entre las altas frecuencias de las "variantes protectoras" del gen AS3MT y el origen local de los habitantes de Quebrada Camarones, históricamente expuestos a los altos niveles de arsénico en el agua?*

#### 4. Hipótesis

H<sub>1</sub>: Las frecuencias genotípicas de las variantes protectoras del gen AS3MT son significativamente mayores en los individuos de origen local de Quebrada Camarones en comparación con los de una muestra control (valle de Azapa).

H<sub>0</sub>: No existen diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas de las variantes protectoras del gen AS3MT al comparar individuos de origen local de Quebrada Camarones con los de la muestra control (valle de Azapa).

#### 5. Objetivos

##### Objetivo General

Evaluar la relación entre las variantes protectoras del gen AS3MT y el origen local de la población de Quebrada Camarones históricamente expuesta a los altos niveles de arsénico en el agua.

##### Objetivos Específicos:

1. Caracterizar los factores de riesgo relacionados con variables socioculturales que contribuyen al efecto tóxico del arsénico, tanto en la muestra de estudio (Camarones) como del control (Azapa).

2. Determinar los genotipos de los cuatro polimorfismos (SNPs) del gen AS3MT asociados a eficiente metabolización, tanto para la muestra de estudio (Q. Camarones) como del control (Azapa).
3. Analizar y comparar la diversidad y diferenciación entre los cuatro polimorfismos (SNPs) del gen AS3MT, tanto para las muestras de estudio (Q. Camarones) como del control (Azapa).
4. Comparar y evaluar si existen diferencias significativas entre las frecuencias génicas y genotípicas de los polimorfismo (SNPs), entre las muestras de la población local de Quebrada Camarones versus las del control (Azapa).
5. Comparar estadísticamente la asociación entre los genotipos y los factores de riesgo, tanto para la muestra en estudio (Q. Camarones) y del control (Azapa).

## **6. Material y Método**

### **6.1 Diseño de estudio**

Las actividades realizadas en esta memoria buscan responder a la pregunta de investigación, a través de la contrastación de nuestra hipótesis. Para ello, las actividades del diseño fueron determinadas según las características de la población en estudio (habitantes de área rural) y del tipo de datos que deseamos conocer (variantes genéticas protectoras). En lo general, nuestro diseño de estudio se contextualiza en la comparación de dos muestras representativas de poblaciones expuestas a diferentes niveles de arsénico en el agua, siendo una de estas nuestro caso de estudio (Camarones con 1000  $\mu\text{g/L}$ ) y la otra nuestro control (Azapa con 10-

20 µg/L). Además, una de las características de tal distinción, es que ambas poblaciones parecieran ser similares en sus características socioculturales y biológicas. En lo particular, nuestro diseño consta de una serie de actividades separadas en una sección de Terreno y otra en Laboratorio (Figura 4). Por último, las actividades se encuentran conectadas e interrelacionadas con el cumplimiento de los objetivos específicos descritos previamente, pues estos conllevan a contrastar nuestra hipótesis de estudio.

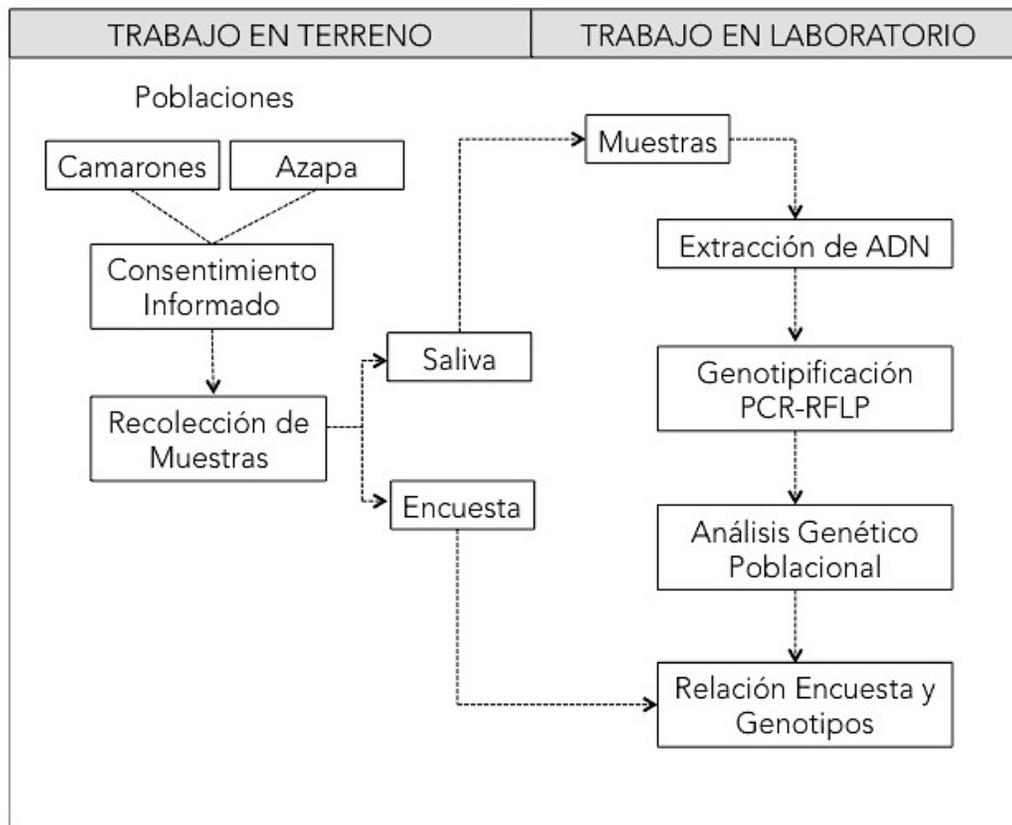


Figura 4. Diseño de estudio

### 6.1.1 Poblaciones y Muestras

Las poblaciones estudiadas en esta memoria son las que habitan en la región de Arica y Parinacota. Esta región está dividida administrativamente en cuatro comunas: Arica, Camarones, Parinacota y General Lagos. Específicamente, las poblaciones de nuestro interés habitan las localidades pertenecientes a dos de estas comunas: Arica y Camarones. La comuna de Arica posee el 89% de la población total de la región (175.441/195.186 habitantes), donde el 90% de sus habitantes reside en la zona urbana (ciudad de Arica), mientras que el 10% restante lo hace en zonas rurales distribuidas entre los valles de Lluta y Azapa. Por otra parte, la comuna de Camarones posee el 0.6% de los habitantes de la región (1.220/195.186), donde su población es absolutamente rural, compuesta por pueblos y aldeas que no superan los 250 habitantes, y que se distribuyen a lo largo de Quebrada de Camarones.

### 6.1.2 Estimación de las Muestras

La estimación del tamaño de la muestra ( $n$ ) para cada población (Camarones y Azapa), fue obtenida mediante la fórmula de estimación para poblaciones finitas:

$$n = \frac{Z^2 * P * Q * N}{d^2(N-1) + Z^2 * P * Q}$$

Donde:

$N$  = Total de la población

$Z^2 = 1.96^2$  (si el nivel de confianza es del 95%)

$P$  = probabilidad de ocurrencia (5% = 0.05)

$Q = 1 - p$  (en este caso  $1 - 0.05 = 0.95$ )

$d$  = precisión o margen de error (en este caso deseamos un 5%).

Para esta estimación, nuestra unidad de observación fueron sólo los habitantes adultos ( $\geq 18$  años de edad) de cada población, residentes en las respectivas zonas rurales (Azapa y Camarones).

Por lo tanto, la muestra de Camarones fue estimada a partir del total de individuos adultos<sup>5</sup> que habitan las localidades de Quebrada Camarones (N=770 habitantes adultos, INE 2002c), obteniendo una muestra ideal de 256 individuos, considerando los parámetros de un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 5%.

Para la muestra control, se utilizó el total de individuos adultos de la población de dos aldeas del valle de Azapa, San Miguel (N=832 habitantes, INE 2002c) y Cerro Sombrero (N=197, INE 2002c), obteniendo un total de individuos adultos para el valle de Azapa de 1029, del cual se estimó una muestra ideal de 280 individuos, bajo los mismo parámetros estadísticos que Camarones.

### 6.1.3 Consentimiento Informado

En primer lugar, y dado el marco jurídico que involucra la obtención y manipulación de material genético humano, es que se consideró imperativo la realización de un **consentimiento informado** individual que fuera aprobado por un comité de ética pertinente con la disciplina de la Antropología Biológica. Por lo anterior, es que el consentimiento informado aplicado en la presente memoria fue aprobado por el “Comité de Ética Para Investigación en Seres Humanos” de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Anexo 1).

---

<sup>5</sup> La población adulta en el censo del 2002 representa el 61% del total (732 de 1220 habitantes), comprendiendo los rangos etarios mayores a 20 años. Los individuos con edades entre 18 y 19 años al encontrarse representados dentro del rango de 15-19 años, no fueron parte del total de la población considerada para la estimación de la muestra, debido a que se desconoce el número exacto de habitantes con esa edad.

#### 6.1.4 Recolección de las Muestras

La toma de muestra se realizó en terreno visitando tres localidades ubicadas en la Quebrada de Camarones y otras tres en el valle de Azapa. Dichas localidades fueron elegidas debido a que poseen un número de habitantes suficientes para constituir el tamaño muestral estimado. Estas localidades fueron en Q. Camarones los pueblos de Esquiña, Illapata y Camarones. Mientras que en el Valle de Azapa, la muestra proviene principalmente del pueblo de San Miguel, y de las aldeas cercanas de Cerro Sombrero y Alto Ramírez, esta última incluida por su cercanía con San Miguel. En ambas zonas de muestreo se procedió a informar a la comunidad respectiva sobre el estudio, mediante la comunicación con juntas de vecinos, informantes claves, y dirigentes de comunidades indígenas. Lo anterior, posibilitó la visita de casa a casa invitando a sus residentes a participar del estudio. Además, de forma particular cada participante fue informado de las condiciones del estudio, mediante la explicación y aceptación del consentimiento informado utilizado en esta memoria.

El tipo de muestra recolectada corresponde a saliva, debido a que es una buena fuente de ADN, y además por ser menos invasiva que otros recursos utilizados en estudios genómicos (p. Ej. sangre) y por su fácil manipulación en el contexto rural. Las muestras fueron recolectadas utilizando un Kit comercial prpIT™-L2P de DNA Genotek, el cual fue elegido debido a su eficiente mecanismo de recolección y conservación. El mecanismo de recolección consistió en solicitar a cada participante del estudio que depositara un total de 2 ml de saliva en los recipientes del Kit, siendo cada uno de estos sellados y refrigerados a una temperatura de 4°C hasta su posterior extracción.

### 6.1.5 Trabajo en Laboratorio

Esta etapa del diseño de la memoria fue realizada en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución Humana de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. La utilización de este laboratorio, se debe principalmente a que posee las herramientas y equipos necesarios para las actividades que den cumplimiento a los objetivos específicos que están relacionados con la determinación de genotipos y análisis genéticos poblacionales.

## 6.2 Metodología

### 6.2.1 Encuesta y Caracterización Poblacional

Para la realización del **Objetivo Específico 1**, que corresponde a la caracterización de factores de riesgo relacionados con variables socioculturales, se elaboró una **encuesta personalizada** que permite sistematizar datos respecto al origen (local o foráneo), sexo, actividad laboral, y otras variables asociadas que contribuyen a la variabilidad inter-individual de los efectos tóxicos del arsénico (Anexo 2). Dichas variables han sido agrupadas según áreas temáticas en la Tabla 2. Las variables de la encuesta fueron operacionalizadas para su posterior análisis descriptivo. En particular, de las áreas temáticas consideradas en la encuesta, la de mayor relevancia fue la residencia, pues es útil para la formación de sub-muestras a partir del origen de los individuos (locales/foráneos). Por último, la encuesta también fue aprobada por el comité de ética antes mencionado, y fue aplicada tanto para las personas incluidas en las muestras de Quebrada Camarones como en las del control (Azapa).

**Tabla 1.** Variables socioculturales y de exposición al arsénico en la encuesta  
(N° P=Número de pregunta)

Área Temática	Variabes	N° P
Residencia	Lugar de nacimiento	1
	Lugar de residencia actual	2
	Historia familiar (generaciones)	3
	Origen (local/Foráneo)	4
Ancestría	Apellidos del padre	5
	Apellidos de la madre	6
	Identidad	7
	Etnia	8
Recursos de Agua	Fuente en la infancia	9
	Fuente en la actualidad	10
Dieta	Procedencia de productos Agrícolas	11
	Procedencia de Carnes rojas	12
	Consumo de Productos Marinos	13
	Consumo de Pan y cereales	14
	Actividad laboral	Tipo de actividad
Enfermedad	Tipo de enfermedad	16
Hidroarsenicismo	Intoxicación por As	17
	Tratamiento	18
Crónico	Signos asociados al As	19
	Síntomas asociados al As	20
Tamaño familiar	N° de hijos	21
	N° de hermanos	22
	N° de tíos	23
Mortandad de hijos	Edad del deceso	24

### 6.2.2 Estructura Genética de Camarones y Azapa

Con motivo de lograr una aproximación a la estructura genética de estas poblaciones, caracterizamos sus linajes maternos y paternos, mediante la determinación de haplogrupos del ADN mitocondrial y cromosoma-Y descritos para grupos originarios de América. Esta caracterización nos permite conocer si las poblaciones representadas poseen una frecuencia de linajes originarios similar a los ya descritos para poblaciones andinas del norte de Chile, así como la presencia de linajes no-americanos en las muestras. Los haplogrupos fueron determinados según protocolos preestablecidos en la literatura y utilizados en el laboratorio. Los haplogrupos que analizaremos son el A, B, C y D para el ADN mitocondrial y algunos del Cromosoma-Y (haplogrupos Q-M3, R, K, I y E) (Moraga et al. 2000; 2001).

De forma particular, utilizamos un segundo grupo de marcadores moleculares conocidos como "repeticiones cortas en tándem" (del inglés Short Tandem Repeat STR). Los STR corresponde a cortas secuencias del ADN (2 a 6 pb) repetidos muchas veces de forma consecutiva, estos se caracterizan por una alta tasa de mutación que conlleva a una variabilidad importante en los cromosomas, y que resulta útil para pruebas de paternidad y estudios de poblaciones. Los STR utilizados en esta memoria corresponden a 11 marcadores en el Cromosoma-Y, disponibles en el kit PowerPlex®System de Promega. Dichos STR fueron analizados en individuos portadores del haplogrupo Q-M3 del Cromosoma-Y (originario de América) tanto en la muestra de Camarones como de Azapa. La lectura de los STR se llevó a cabo mediante secuenciación de los 11 marcadores STR en los individuos portadores de Q. Estos resultados nos permitirán conocer si existen diferencias entre Camarones y Azapa a nivel de individuos masculinos con haplogrupos nativo americanos.

### 6.2.3 Método de Genotipificación (PCR-RFLP)

En cuanto al **Objetivo Especifico 2**, que corresponde a la determinación de los genotipos para los 4 SNPs asociados a eficiente metabolización, se procedió con los siguiente pasos:

- a) En primer lugar, se llevó a cabo la extracción del ADN proveniente de las muestras de saliva, siguiendo el manual de purificación prpIT™-L2P de DNA Genotek. Los respectivos pasos establecidos en este manual se describen en el Anexo 3.
- b) Posterior a la extracción, se realizó la amplificación de los fragmentos de ADN que contienen los sitios polimórficos para los cuatro SNPs, mediante la técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR). Para dicha técnica, fue necesario confeccionar partidores o cebadores (*primers*), utilizando como referencia secuencias de la literatura y el programa de bioinformática de uso libre Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). Los partidores utilizados en esta memoria están descritos en la Tabla 2.
- c) Para la determinación de lo genotipos de cada uno de los cuatro sitios polimórficos, se utilizó la técnica de **genotipificación por PCR-RFLP** (Restriction Fragment Length Polimorphism). Es decir, los productos PCR obtenidos en la amplificación fueron sometidos a digestión por enzimas de restricción (Tabla 3). De tal forma, se obtuvo como resultados esperados los genotipos específicos para cada SNP. Por último, la identificación y cuantificación de los genotipos se realizará mediante una técnica de

electroforesis, obteniendo bandas que indiquen el genotipo de cada SNP para un individuo, siendo este homocigoto o heterocigoto (Figura 5).

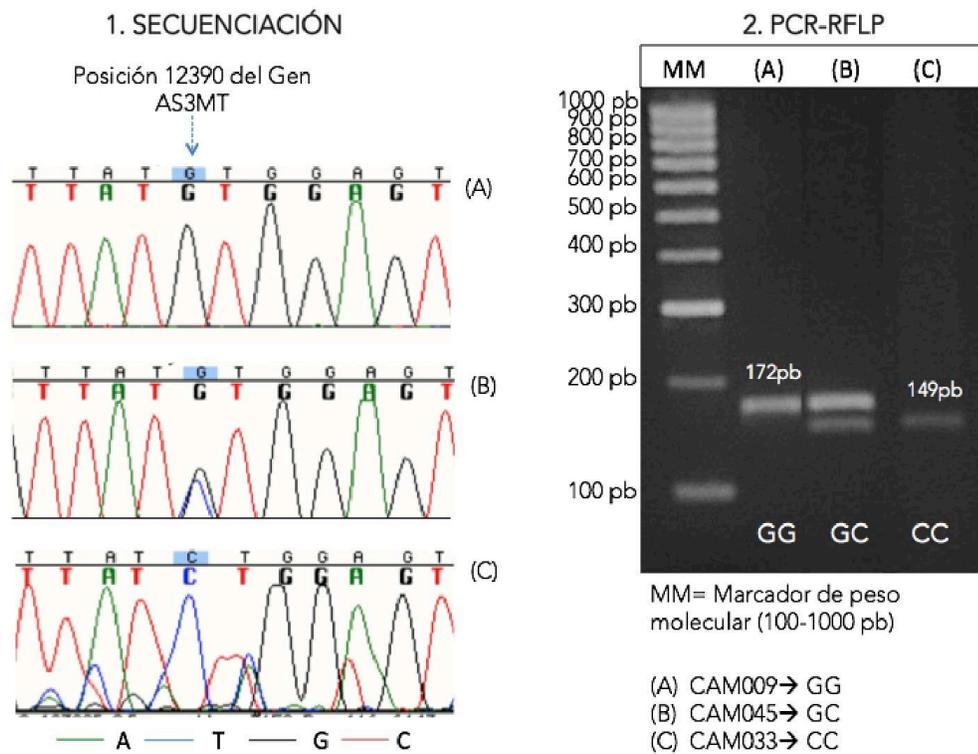
Tabla 2. Partidores utilizados en la amplificación por PCR.

SNP (ID)	Secuencia de Partidores (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño Fragmento (pb)
12390 (rs3740393)	F: GGATAAGCCACTGGGAGGAAA R: GATTAATGATTACATTGACTCCA	55°C	172 pb
14215 (rs3740390)	F: CTGTACAATGGTAACCCCCCA R: GCATGTCATCAGTTATCTTCCT	55°C	102 pb
14458 (rs11191439)	F: GTGCTGGAGATGAACCGTGAA R: GCAAGGGCAAGAGCAGAAAGA	55°C	232 pb
35991 (rs10748835)	F: CACGTGCAAATGACAACCCCA R: TGCACGTCAACCTAAATCAAAC	51°C	227 pb

Tabla 3. Caracterización de genotipos mediante PCR-RFLP.

SNP	Enzima	T (°C)	Sitio de Restricción (5'-3')	Corte (+/-)	Tamaño Fragmentos (pb)
12390 G→C	Hpy188III	37°C	<u>T</u> C/NNGA	(+)	GG: 172 CG: 172 149 23 CC: 149 23
14215 C→T	Hpy188III	37°C	<u>T</u> C/NNGA	(-)	TT: 102 TC: 102 80 22 CC: 80 22
14458 T→C	HpyCH4IV	37°C	A/ <u>C</u> GT	(-)	TT: 232 TC: 232 154 78 CC: 154 78
35991 G→A	ApaLI	37°C	<u>G</u> /TGCAC	(-)	AA: 227 AG: 227 205 GG: 205 22

d) Para corroborar que los polimorfismos analizados están siendo correctamente caracterizados en el PCR-RFLP, se realizó la secuenciación de los fragmentos de PCR de cada uno de los SNPs. La secuenciación se realizó en una submuestra de 12 individuos que fueran portadores de los tres genotipos posibles en cada uno de los cuatro SNPs (12390; 14215; 14458 y 35991), tal como se muestra en el ejemplo de la Figura 5, que caracteriza la genotipos del SNP 12390 en tres individuos.



**Figura 5.** Genotificación del SNP 12390 mediante secuenciación y PCR-RFLP. Los genotipos del SNP 12390 se caracterizan por sus pesos moleculares de GG:172 pb, GC: 172 pb-149 pb-23 pb, y CC: 149 pb-23 pb. La simbología de (A), (B) y (C) corresponden a las muestras analizadas de CAM009, CAM045 y CAM033 respectivamente. Debe corregirse, la secuencia de (B) donde se indica como un genotipo GG, cuando el valor real es GC. En la electroforesis del PCR-RFLP, utilizando un gel de agarosa (1,5 gr. en 50 ml de buffer TAE), el fragmento de 23 pb no logra distinguirse, debido a su pequeño tamaño.

#### 6.2.4 Métodos con Enfoque Genético Poblacional

Para el **Objetivo Especifico 3**, se evaluaron los datos obtenidos a partir del objetivo 2 bajo pruebas estándar con enfoque genético poblacional. Entre estas pruebas se encuentran:

- a) Equilibrio de Hardy-Weinberg, que permite evaluar si las poblaciones representadas por ambas muestras se encontraban o no en equilibrio genético para cada uno de los polimorfismo analizados, es decir, si no estaban siendo afectadas por algún tipo de fuerza evolutiva (selección, deriva génica, mutaciones, falta de panmixia o migraciones) . Esta prueba se evalúa a partir de las frecuencias génicas y genotípicas estimadas para ambas muestras, mediante la aplicación de un test de Ji cuadrado, donde se establece si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores observados y los esperados (sin fuerzas evolutivas operando). Bajo este principio, se espera como resultado que la muestra control se encuentre en equilibrio mientras que la muestra en estudio no lo esté.
  
- b) A partir de los valores de genotipos obtenidos para cada una de las poblaciones estudiadas, se realizó la estimación de haplotipos. La estimación de haplotipos tiene como propósito conocer cuán frecuente son algunas combinaciones de alelos de diferentes loci presentes en un cromosoma. Por ejemplo, para esta memoria utilizando cuatro loci (4 SNPs del cromosoma 10), podríamos observar que existe una mayor frecuencia de combinaciones de alelos protectores (haplotipo CTTA) en la muestra de Camarones. La estimación de haplotipos se realizo a partir del algoritmo de Expectation-Maximization (log EM) en el programa de uso libre Arlequin 3.5 (Excoffier et al.

2010). El log EM se caracteriza por estimar frecuencias de haplotipos de máxima verosimilitud en la población cuando se desconoce la fase gamética de los alelos.

- c) La prueba de *Fst* o índice de fijación, es un estadístico que refleja la subestructuración de las poblaciones por medio del análisis de la reducción de la diversidad genética en las subpoblaciones en relación a la diversidad de la población total (Hartl y Clark, 1997). Este estadístico es informativo para observar el nivel total de la diferenciación genética entre las poblaciones, midiendo en ellas la variación de las frecuencias alélicas (Wright et al., 1978).

La diferenciación a partir del índice de fijación (*Fst*), fue realizada a través de comparaciones pareadas en el software Arlequín 3.5 (Excoffier et al. 2010). La distribución nula de valores de *Fst* para pares de poblaciones bajo la hipótesis de no-diferenciación se obtiene permutando las variantes (en haplotipos para datos diploides) entre los grupos poblacionales, obteniendo así un valor *P* que representa la proporción de permutaciones que conduce a un valor de *Fst* mayor o igual al observado. Los *Fst* son entregados en forma de matrices, y a partir de estos es posible realizar dendrogramas de Neibhorg-Joining, que son una representación gráfica de las distancias obtenidas para cada par de poblaciones a través del programa Mega 4 (Kumar et al. 2004).

En lo práctico, el índice *Fst* toma valores entre 0 y 1, en donde el mínimo teórico "0" se obtiene entre aquellas poblaciones cuyas frecuencias alélicas para determinado locus son iguales, por lo tanto no han experimentado diferenciación genética alguna. Una pauta para la interpretación de los valores

de  $F_{st}$  fue sugerida por Wright (1978), en donde el rango comprendido entre 0 y 0,05 indica poca diferenciación genética; entre 0,05 y 0,15 una diferenciación genética moderada; entre 0,15 y 0,25, una marcada diferenciación genética y valores por sobre 0,25 indican una gran diferenciación genética. El máximo teórico, que corresponde a 1 ocurre cuando cada población está fija en alelos diferentes y en donde la diferenciación genética para ese locus es máxima entre las poblaciones.

- d) Por último, se realizó la genotipificación de los cuatro polimorfismos que contienen variantes protectoras en dos poblaciones del sur de Chile. Las muestras que fueron utilizadas son provenientes de la ciudad de Concepción y de localidades rurales de la comuna de San Juan de la Costa. Ambas muestras están expuestas a rangos de hidroarsenicismo dentro de la norma ( $10 \mu\text{g/L}$ ). En particular, destacamos la elección de la muestra de San Juan de la Costa, pues es una población originaria perteneciente al grupo étnico Huilliche, y con evidencias de marcadores del ADN mitocondrial concordantes con una estructura genética materna originaria de América (Moraga et al., 2000; De Saint Pierre et al., 2012). Los Resultados esperados para estos análisis, son las de entregar una aproximación a la distribución geográfica de la frecuencia de las variantes protectoras del arsénico en poblaciones chilenas.

### 6.2.6 Relación entre las Variables de la Encuesta y Genotipos

Para el **Objetivo Específico 5**, de acuerdo a nuestros resultados obtenidos en la encuesta, principalmente variables que reflejen una mayor diferenciación entre Camarones y Azapa, evaluaremos si también logran diferencias a nivel genotípico, mediante una prueba de homogeneidad de Chi cuadrado.

### 6.2.5 Contrastación de Hipótesis

En cuanto al **Objetivo Específico 4**, que corresponde a comparar y evaluar estadísticamente las diferencias de **frecuencias genotípicas y génicas** entre una individuos de origen local de Camarones versus la muestra del control (locales de Azapa), esto se realizó mediante el estadístico de Ji cuadrado y el test Fisher.

## 7. Resultados

### 7.1 Muestra

La muestra real de Camarones y Azapa fue constituida por 51 individuos respectivamente (Tabla 4). La reducción del tamaño de la muestra en ambos casos, se debió a las dificultades en la recolección en terreno, principalmente por un limitado acceso a las localidades. En las muestras reales de Camarones y Azapa, se pudo estimar que para un nivel de confianza del 95%, el margen de error es de 13.25%<sup>6</sup>.

**Tabla 4.** Localidades de recolección de las muestras

Zona	Localidades	Tamaño de Muestra Real	Tamaño de Muestra Ideal
Valle de Azapa	1. San Miguel	36	<i>n=256</i>
	2. Alto Ramírez	9	
	3. Cerro Sombrero	6	
Quebrada de Camarones	4. Esquiña	13	<i>n=280</i>
	5. Illapata	10	
	6. Camarones	28	

---

<sup>6</sup> Despejando la variable “d” en la fórmula de estimación de tamaños muestrales para poblaciones finitas utilizada en la sección de material y método.

## 7.1 Caracterización Poblacional

### 7.1.1 Encuesta

La encuesta fue aplicada a cada uno de los participantes de esta memoria. Sin embargo, los datos aquí mostrados corresponden al total de individuos que poseen sus respectivos datos genéticos, siendo un total de 50 individuos de Camarones y 47 de Azapa. La encuesta fue tabulada, y analizada de acuerdo a nuestras variables de interés descritas en la Tabla 1. A continuación, se muestran análisis descriptivos para cada una de estas variables, agrupadas según áreas temáticas relevantes en esta memoria.

#### A. Residencia

En la muestra de Camarones, podemos señalar que la mayor parte de los individuos tuvieron como lugar de nacimiento las comunas de Camarones (42%;  $n=21/50$ ), Arica (28%;  $n=14/50$ ) y Parinacota (12%;  $n=6/50$ ), mientras que la categoría de nacimientos fuera de la XV región corresponde al 18% de la muestra ( $n=9/50$ ). En Azapa, los individuos tuvieron como lugar de nacimiento, las comunas de Arica (85.1%;  $n=40/47$ ), Parinacota (4.3%;  $n=2/47$ ) y Camarones (2.1%;  $n=1/47$ ), mientras que el 8.5% ( $n=4/47$ ) restante correspondían a lugares fuera de la región.

La variable de lugar de residencia actual, muestran que el 96% de los individuos de Camarones residen en esta comuna, y sólo dos individuos se declaran como residentes de Arica u otra región. Por otra parte, en Azapa el 100% ( $n=47$ ) de los individuos muestreados se declaran residentes de la comuna de Arica.

Las variables de historia familiar y el origen local/foráneo, fueron las más relevantes para el desarrollo de esta memoria. En este sentido, el origen de un individuo fue definido de acuerdo a su historia familiar indicada a partir del número

de generaciones en la localidad, correspondiendo a un origen local aquellos que poseen dos o más generaciones, mientras que aquellos individuos que recién hubiesen llegado (una generación) o que se declarasen sin historia familiar en la zona fueron categorizados como foráneos. Esta categorización nos permitió definir un total de cuatro sub-muestras: Camarones locales (n=36) y foráneos (n=14); y en Azapa locales (n=31) y foráneos (n=16). En los gráficos de la Figura 6, podemos observar el porcentaje de individuos locales de Camarones según su historia familiar, donde sobresale el 32% que declara que su familia siempre ha vivido en la zona, seguido por el 22% y el 18%, con 3 y 2 generaciones respectivamente. De los foráneos de Camarones, aquellos que residen en las localidades, pero que sólo llevan una generación representan el 29.79%, mientras que los que no poseen historia familiar en la zona corresponden al 4.25%. En la submuestra de Azapa local, la distribución de individuos según su historia familiar es diferente a los locales de Camarones, pues aquí es mayor el porcentaje de individuos con dos generaciones (38.3%), seguido por el 25.53% con tres generaciones y un 2.12% que declara que su familia siempre ha vivido allí. De los foráneos de Azapa, un 29.79% corresponde a individuos con una generación, y un 4.25 sin historia familiar en la zona.

Por último, destacamos que las muestras totales y las cuatro sub-muestras, poseen una similar proporción de individuos masculinos y femeninos. La composición respecto de individuos masculinos y femeninos en cada muestra fue de un 54% (n=27/50) y 46% (n=23/50) en Camarones, y de un 46.8% (n=22/47) y 53.2% (n=25/50) en Azapa.

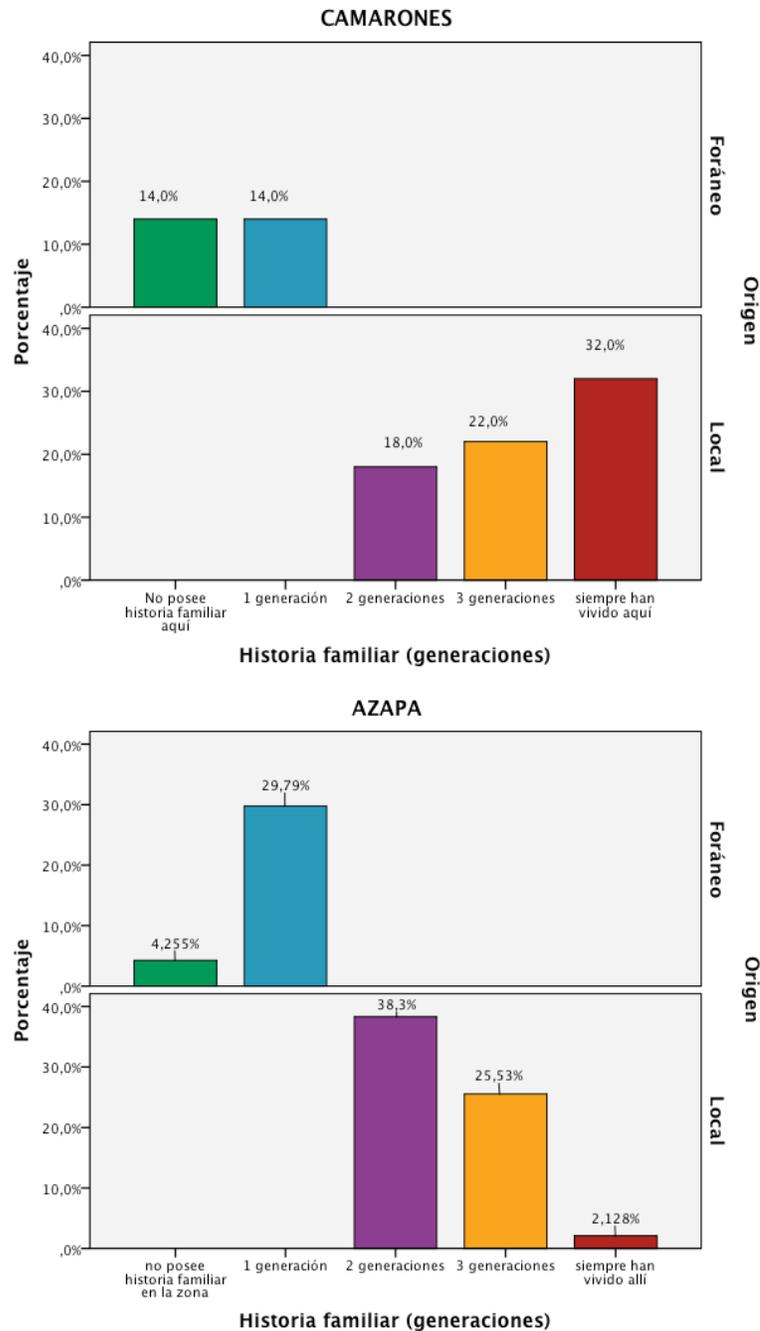


Figura 6. Gráficos de barras para las frecuencias de generaciones (%) agrupadas según el origen local/foráneo en cada una de las muestras (Camarones y Azapa).

## B. Ancestría

Las preguntas 5 y 6, que corresponden a identificar los apellidos del padre y la madre, sólo se utilizaron como guía para conocer si las poblaciones representadas poseen un componente indígena de acuerdo a sus apellidos (Anexo 3).

En cuanto a la percepción de los individuos respecto de su ancestría (pregunta 7), podemos destacar que en Camarones la categoría "Local con ascendencia étnica" fue la más frecuente con un 74% (n=37/50), lo que resulta muy relevante, pues esta respuesta nos alude a la pertenencia a un grupo indígena definido. A continuación, siguen las categorías de "Mestizos" con 16% (n=8/50), "Chilenos sin ascendencia étnica" con un 6% (n=3/50) y "Extranjeros" con un 4% (n=2/50). Por otro lado, a diferencia de Camarones, en la muestra de Azapa la categoría de "Mestizos" fue la más frecuentes con 55.3% (n=26/47), seguidos por "Local con ascendencia étnica" con 42,6% (n=20/47) y "Extranjeros" con un 2.1% (n=1/47).

Las etnias de mayor a menor frecuencias declaradas por lo encuestados en Camarones, fueron la Aymara con un 88% (n=44/50), y un 2% (n=1/50) tanto para Quechua, Diaguita, y Mapuche. Individuos sin etnia en Camarones fueron el 6% (n=3/50). En Azapa, las etnias más frecuentes fueron Aymara (53.2%, n=25/47), Mapuche (2%, n=2/47), Afrodescendiente (2%, n=2/47), y Atacameño (2.1%, n=1/47). Además, a diferencia de Camarones, Azapa contiene más individuos que se declararon si etnia originaria (36.2%, n=17/47).

## C. Recursos de Agua

La principal fuente de agua durante la niñez de los individuos de Camarones fue el río de Camarones 92%(n=46/50), y sólo el 8%(n=4/50) lo hicieron de agua potable. En la actualidad, la fuente de agua más frecuente es la de tipo potable con

un 74% (n=37/50), mientras que un 26% (n=13/50) mantiene como principal fuente hídrica el río de Camarones. No obstante, observaciones de los encuestados, nos permiten señalar que el agua potable es transportada en bidones a las localidades, lo cual no es suficiente para los trabajos agrícola de regadíos, dieta y aseo. Por lo tanto, el río de Camarones mantiene su vigencia como un recurso necesario y utilizado por los habitantes de Camarones.

En Azapa, la principal fuente de agua durante la niñez de los encuestados, fue el agua potable con un 63.8% (n=30/47), el río de Azapa con un 25.43% (n=12/47), y de pozos con un 10.63% (n=5/47). En la actualidad, un similar patrón de uso de fuentes de agua se mantiene, debido en parte a alta producción agrícola del valle, donde los pozos de agua y canales del río son ampliamente utilizados.

#### **D. Signos de toxicidad**

Una sección de la encuesta estaba dedicada a la recolección de información sobre los signos asociados a efectos tóxicos del arsénico (Preguntas 16 a la 20). De estos, destacamos que cuatro individuos de Camarones reconocieron poseer lesiones a la piel (manchas o hiperpigmentación), no así hiperqueratosis u otros signos como cáncer de hígado o riñones. En Azapa, tres individuos reconocen poseer lesiones a la piel (hiperqueratosis como durezas o callosidades).

La pregunta 24, esta relacionada con posibles efectos del arsénico sobre las embarazadas de Camarones y Azapa. En este sentido, 6 individuos de sexo femenino reconocen haber sufrido una pérdida de un hijo durante el embarazo en Camarones. Mientras que en Azapa sólo un individuo femenino reconoció haber sufrido una pérdida durante el embarazo.

### 7.1.2 Marcadores del ADN Mitocondrial y Cromosoma-Y

Respecto al ADN mitocondrial, identificamos cuatro de sus haplogrupos descritos como originarios de América (A, B, C y D). Las frecuencias de estos haplogrupos en Camarones fueron para B (70%), seguido por D (18%) y C (12%). Mientras que en Azapa, la frecuencia más alta también fue la del haplogrupo B (53%), seguido por el haplogrupo D (23%), C (10%) y A (8%). De esta caracterización, la muestra de Azapa se diferenció de Camarones, por poseer el haplogrupo A y además por poseer un 6% de haplogrupos no-americanos originarios.

En cuanto a los haplogrupos del cromosoma-Y, el total de individuos masculinos analizados fueron 25 de Camarones y 17 de Azapa. En ambas muestras, se identificaron el haplogrupo Q-M3 descrito como ancestral de las poblaciones originarias de América, y otros haplogrupos descritos como ancestrales de Europa (R, K e I). La muestra de Camarones mostró tener una mayor frecuencia del haplogrupos Q-M3 (51,8%), seguido por haplogrupo R (33,3%), I (3,7%), y K (3,7%). Por otra parte, Azapa también presenta mayor frecuencia del haplogrupo Q-M3 (34,7%), R (26,08%), I (8,7%) y K (4,3%).

Como un análisis anexo para conocer si la población masculina de Azapa y Camarones poseían diferencias específicas entre los individuos portadores del haplogrupo Q-M3 originario de América, evaluamos marcadores moleculares de microsatélites (STR) utilizados ampliamente en estudios de parentesco y poblacionales. Estos STR mostraron una diferenciación entre los individuos portadores de Q-M3 en Azapa y Camarones, debido principalmente al alelo DYS393\*14 (Figura 9).

En síntesis, respecto a ambas fuentes de evidencias (ADNmt y Crom-Y), podemos señalar que la población de Camarones posee una estructura poblacional

similar a la observada en poblaciones indígenas de la zona andina de Chile. A su vez, contiene una menor frecuencia de linajes paternos característicos de europeos y mestizos americanos, los que podrían haber ingresado a la población original en momentos más recientes (históricos). En cuanto a Azapa, esta población posee una mayor diversidad que Camarones, pues encontramos más haplogrupos maternos (A y No-Americanos) y una mayor frecuencia de haplogrupos paternos europeos (R, K, e I) del cromosoma Y.

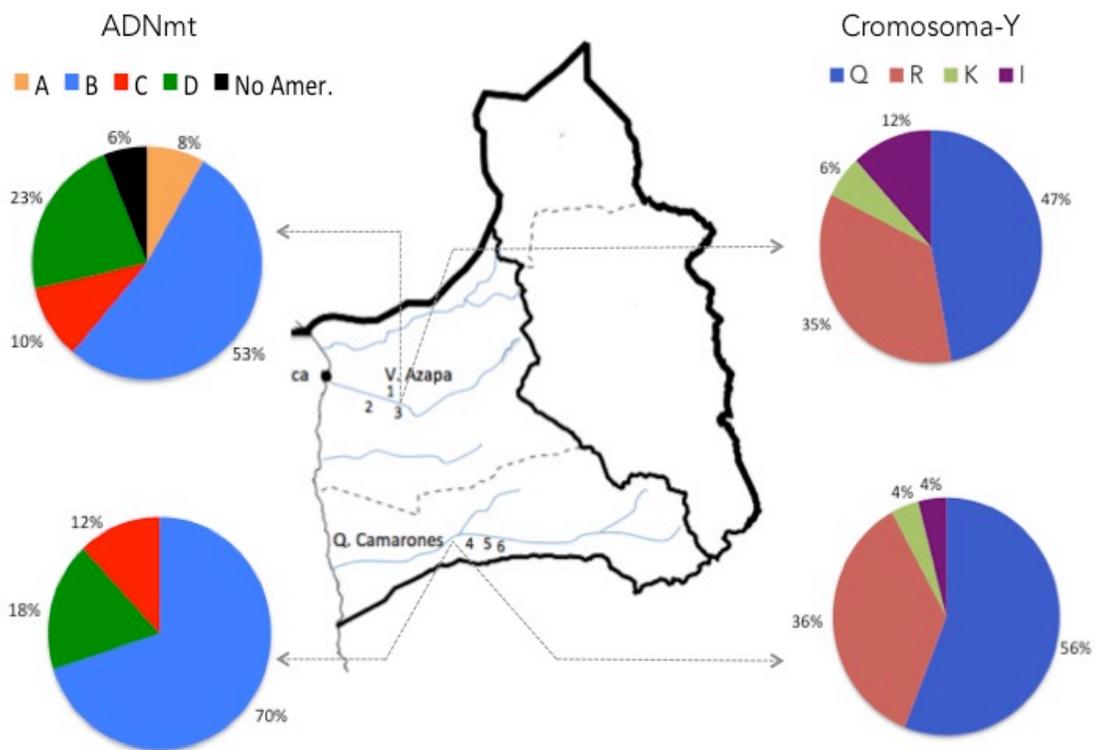


Figura 8. Frecuencias de los haplogrupos del ADN mitocondrial y Cromosoma-Y en muestras de Azapa y Camarones.



## 7.2 Genotipificación de las Variantes Protectoras

La genotipificación se realizó en cada muestra mediante la técnica de PCR-RFLP. Sin embargo, hubieron individuos que no amplificaron, dejando el tamaño total de cada muestra en 50 para Camarones y 47 para Azapa. Las frecuencias y el número de individuos para cada genotipo de los cuatro polimorfismos están descrito en detalle para cada muestra y sub-muestra (Local/Foráneo) en la Tabla 5 y 6.

### 7.2.1 Frecuencias Genotípicas

Del total de la muestra de Quebrada Camarones, se puede observar que existe una mayor frecuencia de genotipos homocigotos con variantes protectoras para cada uno de los polimorfismos: SNP 12390 (CC=44%), SNP 14215 (TT=50%), SNP 14458 (TT=98%), y el SNP 35991 (AA=50%). Valores similares también son reflejados en la suma de los individuos heterocigotos y homocigotos portadores de las variantes protectoras, siendo sus frecuencia del 88% en el SNP 12390 y 14215, y de un 98% para el SNP 14458<sup>7</sup> y el 35991. Por otro lado, la muestra de Azapa también posee una mayor frecuencia de genotipos homocigotos con variantes protectoras, siendo sus valores: SNP 12390 (CC=34%), SNP 14215 (TT=34%), SNP 14458 (TT=87%) y el SNP 35991 (AA=42%). Cuando sumamos el total de los individuos homocigotos y heterocigotos que poseen variantes protectoras en Azapa, las frecuencias se encuentran cercanas al 74% en los SNPs 12390 y 14215, 87% en el SNP 14458 y de un 87% en el SNP 35991.

En cuanto a los genotipos con variantes no-protectoras de Camarones, las frecuencias de homocigotos fueron del 12% para los SNPs 12390 y 14215, y de un 6%

---

<sup>7</sup> Debemos recordar que el heterocigoto del SNP 14458, al igual que el homocigoto CC, confiere el cambio de aminoácidos desde una Metionina a una Treonina, lo cual ha sido asociado con cambios en la actividad enzimática de la enzima AS3MT, favoreciendo un incremento de %MMA, y con ello un mayor riesgo de sufrir efectos tóxicos. Por lo tanto, los homocigotos CC y heterocigotos TC son genotipos no-protectores.

en el SNP 35991. Mientras que para el SNP 14458, no se encontraron homocigotos con variantes no-protectoras (CC), pero si un individuo heterocigoto (TC). En la muestra de Azapa, los homocigotos con variantes no-protectoras tienen una frecuencia del 25% en los SNPs 12390 y 14215, y de un 13% en el SNP 35991. A su vez, en Azapa el SNP 14458 no posee homocigotos (CC), pero si heterocigotos (TC) que alcanzan una frecuencia del 13%.

**Tabla 5.** Frecuencias genotípicas de la muestra de Camarones

Muestra CAM	SNP12390			SNP14215			SNP14458			SNP35991		
	GG	GC	CC	CC	CT	TT	TT	TC	CC	GG	GA	AA
Total (n=50)	0.12 (6)	0.44 (22)	0.44 (22)	0.12 (6)	0.38 (19)	0.50 (25)	0.98 (49)	0.02 (1)	0.00 (0)	0.06 (3)	0.44 (22)	0.50 (25)
Locales (n=36)	0.08 (3)	0.47 (17)	0.44 (16)	0.08 (3)	0.38 (14)	0.52 (19)	0.97 (35)	0.02 (1)	0.00 (0)	0.05 (2)	0.44 (16)	0.50 (18)
Foráneos (n=14)	0.21 (3)	0.36 (5)	0.43 (6)	0.21 (3)	0.36 (5)	0.43 (6)	1.00 (14)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.07 (1)	0.43 (6)	0.50 (7)

**Tabla 6.** Frecuencias genotípicas de la muestra del Valle de Azapa

Muestra AZP	SNP12390			SNP14215			SNP14458			SNP35991		
	GG	GC	CC	CC	CT	TT	TT	TC	CC	GG	GA	AA
Total (n=47)	0.25 (12)	0.40 (19)	0.34 (16)	0.25 (12)	0.40 (19)	0.34 (16)	0.87 (41)	0.13 (6)	0.00 (0)	0.13 (6)	0.45 (21)	0.42 (20)
Locales (n=31)	0.22 (7)	0.48 (15)	0.29 (9)	0.22 (7)	0.48 (15)	0.29 (9)	0.87 (27)	0.13 (4)	0.00 (0)	0.09 (3)	0.51 (16)	0.38 (12)
Foráneos (n=16)	0.31 (5)	0.25 (4)	0.43 (7)	0.21 (5)	0.36 (4)	0.43 (7)	0.87 (14)	0.13 (2)	0.00 (0)	0.07 (3)	0.43 (5)	0.50 (8)

### 7.2.2 Frecuencias Génicas

Las frecuencias génicas (alélicas) fueron estimadas a partir de los genotipos para cada uno de los polimorfismos en estudio. Dicha estimación se encuentra resumida en la Tabla 7. De las frecuencias génicas, podemos observar que tanto en ambas muestras las variantes alélicas protectoras están en mayor frecuencia que las no-protectoras, siendo sus frecuencias en Camarones: SNP 12390 (alelo C=66%), SNP 14215 (alelo T=69%), SNP 14458 (alelo T=99%) y SNP 35991 (alelo A=72%). Mientras que en la muestra total de Azapa, los valores fueron: SNP 12390 (C=54%), SNP 14215 (T=54%), SNP 14458 (T=94%) y del SNP35991 (A=35%).

**Tabla 7.** Frecuencias génicas de las variantes protectoras en muestras de Camarones y Azapa.

SNP	Alelos	CAM Total n=50	CAM Locales n=36	CAM Foráneos n=14	AZP Total n=47	AZP Locales n=31	AZP Foráneos n=16
12390	G	0.34	0.32	0.39	0.46	0.47	0.44
	C	0.66	0.68	0.61	0.54	0.53	0.56
14215	C	0.31	0.28	0.39	0.46	0.47	0.44
	T	0.69	0.72	0.61	0.54	0.53	0.56
14458	T	0.99	0.99	1.00	0.94	0.94	0.94
	C	0.01	0.01	0.00	0.06	0.06	0.06
35991	G	0.28	0.28	0.29	0.35	0.35	0.34
	A	0.72	0.72	0.71	0.65	0.65	0.66

### 7.2.3 Diferencias Genotípica y Génicas entre Locales de Camarones y Azapa

Se evaluó si existen diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas de Camarones y la muestra control (Azapa). Para ello, se consideró sólo los individuos determinados como locales en ambos valles (con una historia familiar de dos o más generaciones). Para evaluar la hipótesis de homogeneidad entre ambas submuestras,

se utilizó el test exacto de Fisher con un 95% de confianza, y no el Chi cuadrado, debido a que este último aumenta el error tipo II con valores menores a 5. De la comparación, se obtuvo que las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo no poseían diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Prueba de homogeneidad de las frecuencias genotípicas entre las submuestras locales de Camarones y Azapa.

Muestra	SNP12390			SNP14215			SNP14458			SNP35991		
	GG	GC	CC	CC	CT	TT	TT	TC	CC	GG	GA	AA
CAM	0.08	0.47	0.44	0.08	0.38	0.52	0.97	0.02	0.00	0.05	0.44	0.50
Locales	(3)	(17)	(16)	(3)	(14)	(19)	(35)	(1)	(0)	(2)	(16)	(18)
AZP	0.22	0.48	0.29	0.22	0.48	0.29	0.87	0.13	0.00	0.09	0.51	0.38
Locales	(7)	(15)	(9)	(7)	(15)	(9)	(27)	(4)	(0)	(3)	(16)	(12)
Test Exacto de Fisher ( $p < 0.05$ )	$p=0.216$ ; <i>dos colas</i>			$p=0.09872$ ; <i>dos colas</i>			$p=0.1739$			$p=0.6498$ ; <i>dos colas</i>		

Por otra parte, se realizaron comparaciones de frecuencias génicas entre las submuestras locales de Camarones y Azapa para cada uno de los polimorfismos (Tabla 9). De tales comparaciones, sólo las diferencias génicas del SNP 14215, donde el alelo protector T es más frecuente en locales de Camarones que en locales de Azapa, fueron estadísticamente significativas ( $P=0.036$ ).

**Tabla 9.** Diferencias génicas entre locales de Camarones y Azapa.

SNP	Alelos	CAM Locales (n=36)	AZP Locales (n=31)	Pruebas estadísticas de Homogeneidad	
	Nº de alelos	72	62	Ji Cuadrado de Pearson	Test Exacto de Fisher
12390	G C	23 49	29 33	$\chi^2= 2.492$ ; gl=1; $p=0.1144$	2 colas; $p= 0.1093$
14215	C T	20 52	29 33	$\chi^2=4.396$ ; gl= 1; $p= 0.0360^*$	2 colas; $p= 0.0307^*$
14458	T C	71 1	58 4	$\chi^2=1.176$ ; gl= 1; $p= 0.2781$	2 colas; $p=0.1816$
35991	G A	20 52	22 40	$\chi^2= 0.596$ ; gl= 1; $p= 0.4401$	2 colas; $p=0.3565$

### 7.3 Análisis Genético Poblacional

#### 7.3.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

En ambas muestras, a partir de las frecuencias génicas observadas, se establecieron los valores esperados para los genotipos de cada SNP. A partir de estas, fue posible calcular si existían o no diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas en cada uno de los polimorfismos estudiados en Camarones y Azapa. Para ello, se aplicó una prueba de Ji cuadrado con un 95% de confianza. Las Tablas 10 y 11 muestra los valores de genotipos observados y esperados para cada polimorfismo, y su respectiva prueba de homogeneidad, mediante el estadístico de Ji cuadrado ( $\chi^2$ ). El valor de  $\chi^2$  y su respectivo *p-valor* no son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) para rechazar la hipótesis de homogeneidad, por lo que se concluye que ambas poblaciones se encuentra en equilibrio genético para cada uno de los polimorfismos analizados.

**Tabla 10.** Prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg en Camarones

Muestra	SNP 12390			SNP 14215			SNP 14458			SNP 35991		
	GG	GC	CC	CC	CT	TT	TT	TC	CC	GG	GA	AA
CAM Obs.	0.12	0.44	0.44	0.12	0.38	0.50	0.98	0.02	0.00	0.06	0.44	0.50
Total Esp.	0.11	0.44	0.43	0.09	0.42	0.47	0.98	0.01	0.00	0.08	0.40	0.52
Ji Cuadrado (p-valor)	$\chi^2=0.348$ (0.983)			$\chi^2=0.701$ (0.704)			$\chi^2=0$ (1)			$\chi^2=0.515$ (0.773)		

**Tabla 11.** Prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg en Azapa

Muestra	SNP 12390			SNP 14215			SNP 14458			SNP 35991		
	GG	GC	CC	CC	CT	TT	TT	TC	CC	GG	GA	AA
AZP Obs.	0.25	0.40	0.34	0.25	0.40	0.34	0.87	0.13	0.00	0.13	0.45	0.42
Total Esp.	0.21	0.49	0.29	0.21	0.49	0.29	0.87	0.12	0.00	0.12	0.45	0.42
Ji Cuadrado (p-valor)	$\chi^2=1.654$ (0.437)			$\chi^2=1.654$ (0.437)			$\chi^2=0$ (1)			$\chi^2=0.035$ (0.983)		

### 7.3.2 Estimación de Haplotipos

La estimación de haplotipos realizada a partir del algoritmo de Expectation-Maximization (log EM) fue aplicada a cada una de las muestras, y los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 12. La estimación mostró que las combinaciones de variantes más frecuentes en la muestra de Camarones Locales fueron el haplotipo CTTA (68%), GCTG (23%) y GTTA (4%). En cuanto a Azapa, los haplotipos más frecuentes en su submuestra local fueron CTTA (48%), GCTG (26%) y GCTA (16%). De estos resultados, se puede destacar el haplotipo con todas las variantes protectoras CTTA como el más frecuente en ambas submuestras locales de Azapa y Camarones. Por otro lado, el haplotipo con más variantes no-protectoras GCTG estuvo también frecuente en ambas muestras locales con valores entre el 23-26% (Tabla 13). También

se observan leves cambios al comparar las frecuencias de los haplotipos del total, locales y foráneos. Por ejemplo, el haplotipo CTTA tiende a disminuir en la submuestra de foráneos respecto a los locales en Camarones, y el haplotipo GCTG aumenta levemente en los foráneos respecto a los locales de cada submuestra.

**Tabla 12.** Frecuencia de Haplotipos en Muestras de Camarones y Azapa

Haplotipos	CAM Total	CAM Local	CAM Foráneo	AZP Total	AZP Local	AZP Foráneo
N	50	36	14	47	31	16
CTTA	0.66	0.68	0.60	0.50	0.48	0.53
CTTG	-	-	-	0.02	0.01	0.03
GTTA	0.01	0.01	-	-	-	-
GTTG	0.03	0.04	-	-	-	-
GCTA	0.04	0.01	0.11	0.13	0.16	0.06
GCTG	0.25	0.23	0.28	0.27	0.26	0.31
GCCA	0.01	0.01	-	0.04	0.03	0.06
GCCG	-	-	-	0.03	0.05	-

### 7.3.3 Diferenciación Poblacional

Se analizaron las frecuencias de haplotipos obtenidas para cada muestra y submuestra a partir de una matriz de comparaciones pareadas de Fst. Sin embargo, ninguna diferenciación resultó ser estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

En Camarones, los valores de Fst al comparar la muestra total con cada una de las submuestras de locales y foráneos, resultó tener un valor de 0,03 para ambos casos, lo que se puede interpretar como una escasa diferenciación genética ( $F_{st} = 0-0.05$ ). En Azapa, también existe una escasa diferenciación entre cada submuestra de locales ( $F_{st} = 0,03$ ) y foráneas ( $F_{st} = 0,02$ ) respecto del total.

Al comparar las muestras locales de Camarones y Azapa ( $F_{st} = 0,10$ ), se obtiene el valor más alto de Fst, mostrando una moderada diferenciación, lo que resulta congruente con las diferencias observadas entre los genotipos protectores de ambas

submuestras (aproximadamente un 10% más en Camarones), pero que no resultaron ser estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 13.** Comparaciones pareadas de Fst entre las muestras de Camarones (CAM) y Azapa (AZP).

	CAM	CAM Local	CAM Foráneo	AZP	AZP Local	AZP Foráneo
CAM	0	-	-	-	-	-
CAM Local	0,03951	0	-	-	-	-
CAM Foráneo	0,03222	0,05168	0	-	-	-
AZP	0,06576	0,0866	0,01854	0	-	-
AZP Local	0,07512	0,10052	0,01831	0,03759	0	-
AZP Foráneo	0,03861	0,06081	0	0,02291	0,02753	0

Los resultados hasta aquí presentados, nos han mostrado una clara diferenciación entre las muestras locales de Camarones y de Azapa (frecuencias genotípicas, génicas, de haplotipos y Fst). Dichas diferencias resultan relevantes si consideramos que el origen local de la población de Camarones es nuestro principal eje de estudio. Por estas razones, en los siguientes análisis sólo utilizaremos la muestra local de Camarones para las comparaciones con otras poblaciones, y en algunos casos los valores de Azapa local, como referencia.

#### 7.3.4 Comparación con Poblaciones Expuestas a Diferentes Niveles de Arsénico.

##### A. Comparación con poblaciones del sur de Chile expuestas a niveles de arsénico en la norma (10 µg/L)

En primer lugar, se genotipificaron los cuatro polimorfismos en una muestra de la ciudad de Concepción (n=50) y otra de indígenas Huilliches de San Juan de la Costa (n=45). Para estas, también se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg, y se realizaron pruebas de Ji cuadrado para desestimar la hipótesis de homogeneidad. Los

resultados mostraron que ambas muestras se encontraban en equilibrio genético para cada uno de los polimorfismos (datos no mostrados).

Los genotipos de cada muestra se encuentran resumidos en la Tabla 14. De estos resultados pueden destacarse la mayor frecuencia de genotipos no-protectores en las muestras del sur, siendo en Concepción: SNP 12390 (GG: 64%), 14215 (CC: 56%), 14458 (TC+CC: 36%), y 35991 (GG: 28%). A su vez, en la muestra de Huiliches se acentúa tal patrón de genotipos no-protectores: SNP 12390 (GG: 82%), 14215 (CC: 82%), 14458 (TC+CC: 33%), y 35991 (GG: 40%). En concordancia, en ambas muestras la frecuencia de los genotipos protectores para cada uno de los polimorfismo, fueron mucho menores.

**Tabla 14.** Frecuencia genotípicas de las muestras de Concepción, Huiliches y Camarones locales.

Muestra CAM	SNP12390			SNP14215			SNP14458			SNP35991		
	GG	GC	CC	CC	CT	TT	TT	TC	CC	GG	GA	AA
Concepción (n=50)	0.64 (32)	0.34 (17)	0.02 (1)	0.56 (28)	0.26 (13)	0.18 (9)	0.64 (32)	0.34 (17)	0.02 (1)	0.28 (14)	0.56 (28)	0.16 (8)
Huiliches (n=45)	0.82 (37)	0.17 (8)	0.00 (0)	0.82 (37)	0.17 (8)	0.00 (0)	0.66 (30)	0.33 (15)	0.00 (0)	0.40 (18)	0.42 (19)	0.17 (8)
CAM Locales (n=36)	0.08 (3)	0.47 (17)	0.44 (16)	0.08 (3)	0.38 (14)	0.52 (19)	0.97 (35)	0.02 (1)	0.00 (0)	0.05 (2)	0.44 (16)	0.50 (18)

**Tabla 15.** Diferencias genotípicas entre Camarones Local y poblaciones del sur de Chile.

Muestra	CAM local			
	SNP12390	SNP14215	SNP14458	SNP35991
CON (n=50)	p= 1.477e-09*; dos colas	p= 6.164e-06*; dos colas	p= 0.0002023 *; dos colas	p= 0.0006727*; dos colas
HUI (n=45)	p= 4.114e-13 *; dos colas	p= 8.52e-14 *; dos colas	p= 0.0005084 * dos colas	p= 0.0001986 *; dos colas

\*  $p < 0.05$

La Tabla 15, nos muestra si las diferencias observada entre los polimorfismos (SNPs), a nivel de sus genotipos, resultan ser significativas al comparar las muestras de Concepción y Huiliches versus Camarones Local. Dichas comparaciones se evaluaron mediante una prueba de Ji cuadrado con un 95% de confianza. Los resultados de Ji cuadrado y sus respectivos valores de  $P$ , mostraron que existen diferencias estadísticamente significativas entre cada loci de Camarones Local y las dos poblaciones del sur de Chile ( $p < 0.05$ ).

Por último, en cuanto a las poblaciones del sur de Chile, también les realizamos un análisis de estimación de haplotipos a partir de las frecuencias genotípicas, mediante el algoritmo log EM. Dichas estimaciones mostraron que las combinaciones de variantes alélicas más frecuentes de los cuatro loci para la muestra de Concepción fueron: GCTG (36%), GTTA (16%), GCTA (16%) y GCCG (11%). Mientras que en la muestra de Huiliches, los haplotipos más frecuentes fueron: GCTG (46%), GCTA (30%) y GCCG (14%). Dichos haplotipos son muy relevantes, pues están compuestos con variantes no-protectoras, siendo principalmente los haplotipos GCTG y GCCG los de mayor frecuencia en estas muestras del sur de Chile. Por el contrario, el haplotipo CTTA definido como protector del hidroarsenicismo, se

encuentra con tan sólo un 6% y 8% en Concepción y Azapa, respectivamente. En síntesis, se observa una distribución de genotipos y haplotipos diferentes entre las muestras provenientes del sur y norte de Chile. En el sur, observamos mayor frecuencia de variantes no-protectores en genotipos y haplotipos versus la mayor frecuencia de las variantes protectoras en el norte. A su vez, destacamos dichas diferencias, con especial forma entre la muestra indígena de Huilliches, versus la de Camarones Local, que mayoritariamente es perteneciente a la etnia Aymara (Figura 10).

**Tabla 16.** Diferencias en las frecuencia de haplotipos del gen AS3MT en las muestras de Concepción, Huilliches y Camarones Local.

Haplotipos	CAM Local	Concepción (CON)	Huilliches (HUI)
N	36	14	47
CTTA	0.68	0.06	0.08
CTTG	-	0.02	0.0
CCTA	-	0.03	-
GTTA	0.01	0.16	-
GTTG	0.04	0.02	-
GTCA	-	0.02	-
GTCG	-	0.01	-
GCTA	0.01	0.16	0.30
GCTG	0.23	0.36	0.46
GCCA	0.01	0.05	-
GCCG	-	0.11	0.14

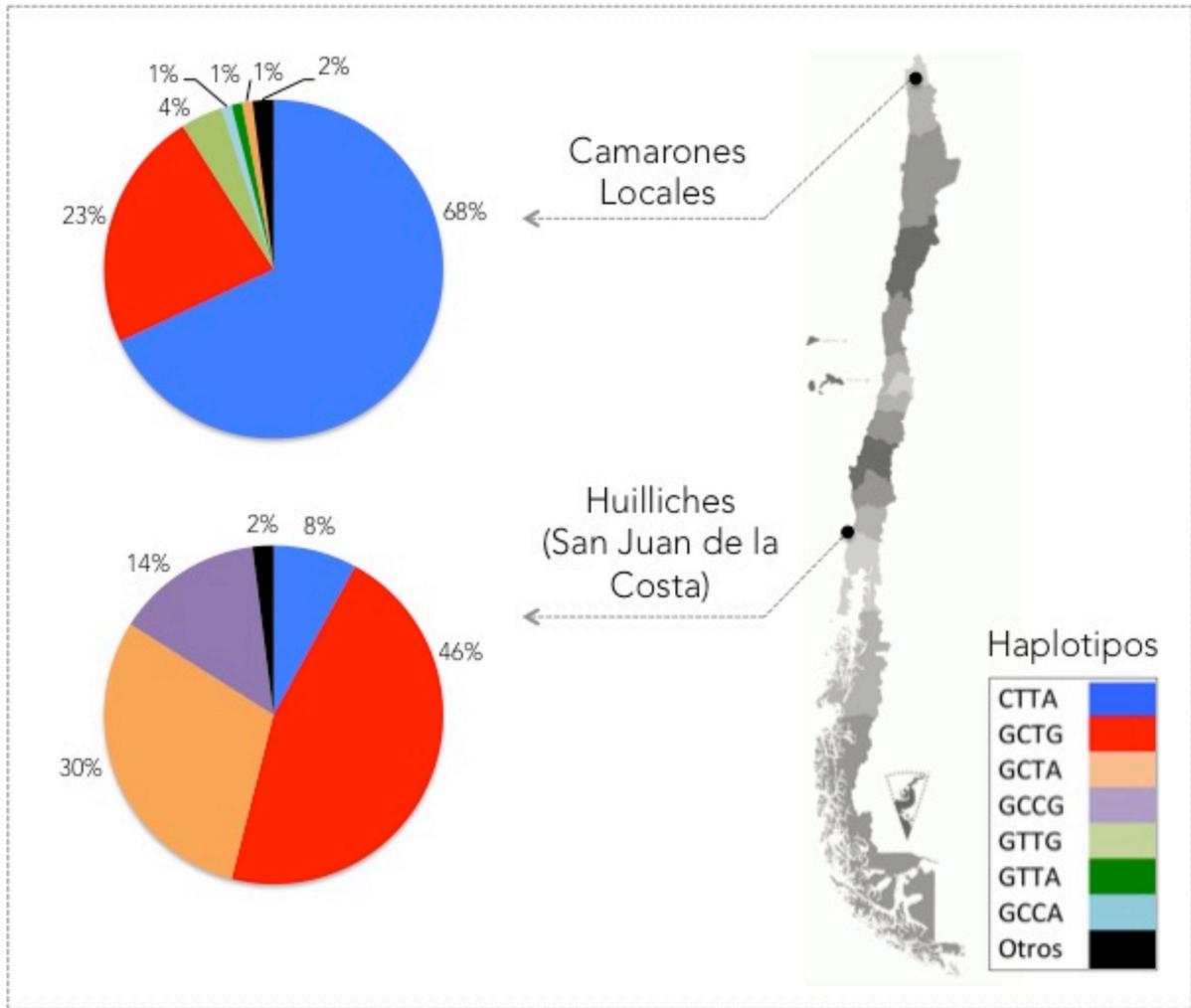


Figura 10. Frecuencia de Haplotipos del Gen AS3MT en Camarones locales y Huiliches.

## B. Comparación con poblaciones expuestas a altos niveles de arsénico (200-700 µg/L).

Evaluamos si existen diferencias significativas entre la frecuencias genotípicas observadas en Camarones versus otras poblaciones expuestas a altos niveles de arsénico en el agua. Para ello se seleccionaron los datos publicados a la fecha<sup>8</sup>, que hicieran referencia a los genotipos de los SNP 12930, 14215 y 35991. Estos SNPs son descritos como fuertemente asociados a una eficiente segunda metilación (%DMA), por lo tanto con una alta capacidad metabolizadora del arsénico. No se consideró el SNP 14458, pues su variante derivada está asociada fuertemente con una primera metilación (%MMA), lo que aumenta el riesgo de efectos tóxicos, principalmente a través de lesiones a la piel y micro-núcleos. No obstante, su respectivo análisis comparativo se muestra posteriormente.

A continuación, en la Tabla 17 se muestran la frecuencia de los genotipos para los tres loci asociados a eficiente metabolización. En estos datos, se incluye la población de San Antonio de los Cobres (SAC), del noroeste argentino, y las de Camarones Local y Azapa Local como representantes de Sudamérica. Además, se incluyen poblaciones del sudeste asiático como Bangladesh, Vietnam, Taiwán y China.

---

<sup>8</sup> [31 de Noviembre de 2014]

**Tabla 17.** Frecuencias de genotipos protectores en poblaciones expuestas al hidroarsenicismo.

Muestras	SNP 12390			SNP 14215			SNP 35991		
	GG	GC	CC	CC	CT	TT	GG	GA	AA
CAM Local	0.08 (3)	0.47 (17)	0.44 (16)	0.08 (3)	0.38 (14)	0.52 (19)	0.05 (2)	0.44 (16)	0.50 (18)
AZP Local	0.22	0.48	0.29	0.22	0.48	0.29	0.09	0.51	0.38
SAC	0.06 (7)	0.43 (48)	0.51 (57)	0.06 (9)	0.35 (51)	0.59 (85)	0.06 (9)	0.36 (52)	0.58 (85)
BANGLADESH	0.67 (240)	0.29 (105)	0.04 (13)	SD	SD	SD	0.27 (95)	0.54 (189)	0.19 (67)
VIETNAM	0.59 (59)	0.37 (37)	0.04 (4)	SD	ND	SD	0.18 (19)	0.43 (45)	0.38 (39)
TAIWÁN	0.47 (97)	0.45 (93)	0.07 (14)	SD	SD	SD	SD	SD	SD
CHINA	SD	SD	SD	SD	SD	SD	0.51 (34)	0.41 (27)	0.07 (5)

(SD=Sin Datos)

Como se señaló previamente, comparamos la frecuencia de los genotipos para cada uno de los SNPs entre Camarones Local y las poblaciones incluidas en la Tabla 17. En lo que respecta a las provenientes del continente americano, recordamos que Camarones Local no posee diferencias estadísticamente significativas con Azapa Local, sin embargo existen leves diferencias entre sus frecuencias de genotipos protectores. En la comparación de Camarones Local con SAC, las frecuencias de los genotipos son similares, aunque levemente mayores en los genotipos homocigotos con variantes protectoras (p. Ej. El SNP 12390, posee un 44% del genotipo CC en Camarones Local y un 51% en SAC).

La comparación con las poblaciones del sudeste asiático, mostraron que Camarones tuvo diferencias estadísticamente significativas con las poblaciones de Bangladesh, Vietnam y Taiwán en las frecuencias genotípicas del SNP 12390 ( $p < 0.05$ , ver Tabla 18), Mientras que para el SNP 35991, las diferencias significativas fueron sólo con Bangladesh y China.

**Tabla 18.** Comparación entre frecuencias genotípicas de polimorfismos asociados a eficiente metabolización en diferentes poblaciones expuestas a arsénico.

Muestra	Test de Fisher		
	SNP12390	Camarones Local SNP14215	SNP35991
SAC	$p = 0.7897$ ;	$p = 0.787$	$p = 0.6173$
BANGLADESH	$p = 2.2e-16^*$	SD	$p = 3.079e-05^*$
VIETMAN	$p = 1.653e-10^*$	SD	$p = 0.1426$
TAIWÁN	$p = 3.483e-11^*$	SD	SD
CHINA	SD	SD	$p = 8.324e-08^*$

\* $p < 0.05$ ; SD=Sin Datos

### C. Comparación de haplotipos con poblaciones sudamericanas expuestas a altos niveles de arsénico

Estimamos las frecuencias de los haplotipos de Camarones Local, Azapa Local, Concepción y Huilliches, a partir de sólo tres polimorfismos (SNPs 12390, 14215 y 35991) para compara dichas frecuencias con las ya publicadas en otros trabajos (Schelebush et al. 2013). La estimación de los haplotipos y los datos incluidos de otras poblaciones, se resumen en la Tabla 19. Las poblaciones con frecuencias de haplotipos para estos tres SNPs, son SAC (San Antonio de los Cobres), Salta (ciudad mestiza del noroeste argentino), y peruanos (principalmente de la región de Puno).

**Tabla 19.** Frecuencias de haplotipos del gen AS3MT a partir de tres loci asociados a eficiente metabolización.

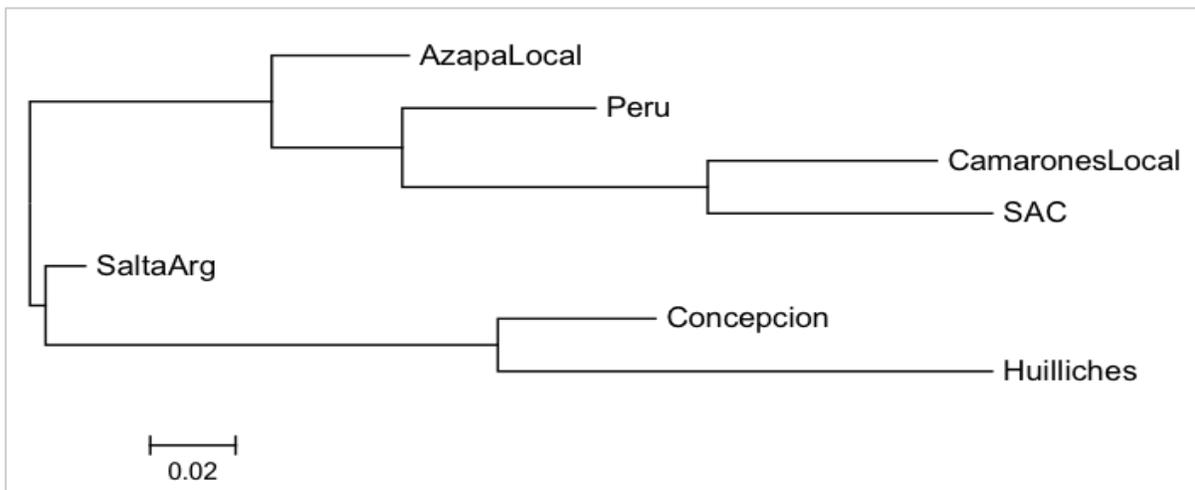
Haplotipos	CAM Local	AZP Local	CON	HUI	SAC	SALTA	PERÚ
N	36	31	14	47	243	23	97
CTA	0.68	0.48	0.11	0.08	0.68	0.37	0.50
CTG	-	0.01	0.03	-	0.00	0.03	0.02
CCA	-	-	0.03	-	0.00	0.04	0.00
GTA	0.01	-	0.10	-	0.00	0.04	0.00
GTG	0.04	0.01	0.07	-	0.00	0.04	0.00
GCA	0.02	0.16	0.20	0.30	0.04	0.17	0.08
GCG	0.23	0.30	0.46	0.61	0.25	0.26	0.40

A partir de la frecuencia de haplotipos, realizamos comparaciones pareadas de  $F_{st}$  entre las poblaciones de la Tabla 19. Obteniendo una matriz de valores de  $F_{st}$  con el objetivo de realizar un dendrograma de distancias genéticas (Tabla 20). Dicho análisis se representa en la Figura 11. En esta figura, destacamos que un grupo de poblaciones que incluyen a Camarones Local, SAC, Perú y Azapa Local versus un segundo grupo compuesto por la población mestiza de Salta, Concepción y Huilliches. Dichas distancias, resultan ser congruentes con una distribución geográfica, en que encontramos que en la zona norte Azapa Local y Perú se asemejan más, así como Concepción y Huilliches en la zona sur de Chile. De Camarones Local y SAC las distancias muestran una estrecha cercanía, lo que resulta interesante si consideramos que ambas poblaciones se encuentran expuestas a altos niveles de arsénico, pero ubicada geográficamente separadas (Camarones en el

norte de Chile, y SAC en la Puna Argentina) y además con grupos étnicos diferentes culturalmente (Camarones con Aymaras y SAC con Atacameños).

**Tabla 20.** Matriz de comparaciones pareadas de Fst a partir de haplotipos del gen AS3MT en poblaciones expuestas arsénico de América.

	CAM Local	AZP Local	CON	HUI	SAC	SALTA	PERÚ
CAM Local	0	-	+	+	-	+	-
AZP Local	0,04641	0	+	+	+	-	-
CON	0,04532	0,12431	0	-	+	-	+
HUI	0,38597	0,20918	0,04104	0	+	+	+
SAC	0,00548	0,05679	0,31203	0,39914	0	+	+
SALTA	0,08754	0	0,067	0,16343	0,11384	0	-
PERÚ	0,06433	0,01219	0,13204	0,19948	0,07327	0,03007	0



(+) valores con significancia estadística ( $p < 0.05$ )

**Figura 11.** Dendrograma de Neighbor-Joining para distancias genéticas a partir de frecuencias de haplotipos del gen AS3MT en poblaciones expuestas al arsénico.

#### D. Variación del polimorfismo 14458 (Met<sup>287</sup>Thr) asociado a un patrón de primera metabolización (%MMA) en diferentes poblaciones expuestas al arsénico.

Esta sección está destinada a analizar de forma separada el polimorfismo 14458. Como se señaló en los antecedentes, individuos portadores de los genotipos TC o CC del SNP 14458, provocan un cambio de aminoácidos, desde una Metionina a una Treonina en la posición 287 del exón 9, en el gen AS3MT. Este cambio de aminoácidos, ha sido fuertemente asociado con un aumento significativo del porcentaje de MMA en individuos expuestos a arsénico. A su vez, la presencia de tales genotipos (TC o CC) se encuentran asociados con signos de toxicidad, como por ejemplo lesiones a la piel en poblaciones asiáticas. Por estas razones, dichas variantes y sus genotipos respectivos las denominaremos como "de toxicidad".

A continuación, comparamos los genotipos de toxicidad entre diferentes poblaciones expuestas al arsénico. Las comparaciones se realizaron entre la frecuencia de portadores de genotipos con variantes ancestrales (TT; Met<sup>287</sup>Met) versus los portadores de genotipos de toxicidad (TC+CC; Met<sup>287</sup>Thr), siendo esta categorización ampliamente utilizada en estudios previos (Antonelli et al. 2014). En la Tabla 21, se muestran los datos recolectados para realizar la comparación.

**Tabla 21.** Variación del SNP 14458 (Met<sup>287</sup>Thr) en diferentes poblaciones expuesta al arsénico.

Muestras	SNP 14458		
	N	Met <sup>287</sup> Met (TT)	Met <sup>287</sup> Thr (TC+CC)
CAM	36	35	1
Local		(0.97)	(0.02)
AZP	31	27	4
Local		(0.87)	(0.12)
CON	50	32	18
		(0.64)	(0.36)
HUI	45	30	15
		(0.66)	(0.33)
ANT	125	101	24
		(0.80)	(0.19)
SAC	169	163	6
		(0.96)	(0.03)
MEX			
Sin Lesiones	51	47	4
		(0.92)	(0.07)
Con Lesiones	71	60	11
		(0.84)	(0.15)
BAN	355	313	42
		(0.88)	(0.11)
BAN2	884	792	97
		(0.89)	(0.10)
EUR	411	324	87
		(0.79)	(0.21)

La comparación fue realizada mediante una matriz de comparaciones pareadas de Fst, para evaluar que poblaciones se encuentran más distantes a partir de la frecuencia de sus genotipos. La Tabla 22, muestra las comparaciones pareadas de las poblaciones con un valor de significancia estadística (P<0.05). De este análisis, podemos señalar que Camarones es genéticamente distante, con una significancia estadística (indicado en la tabla con +), de individuos expuestos a arsénico de Europa del Este (Liendberg et al., 2007), mexicanos con lesiones a la piel

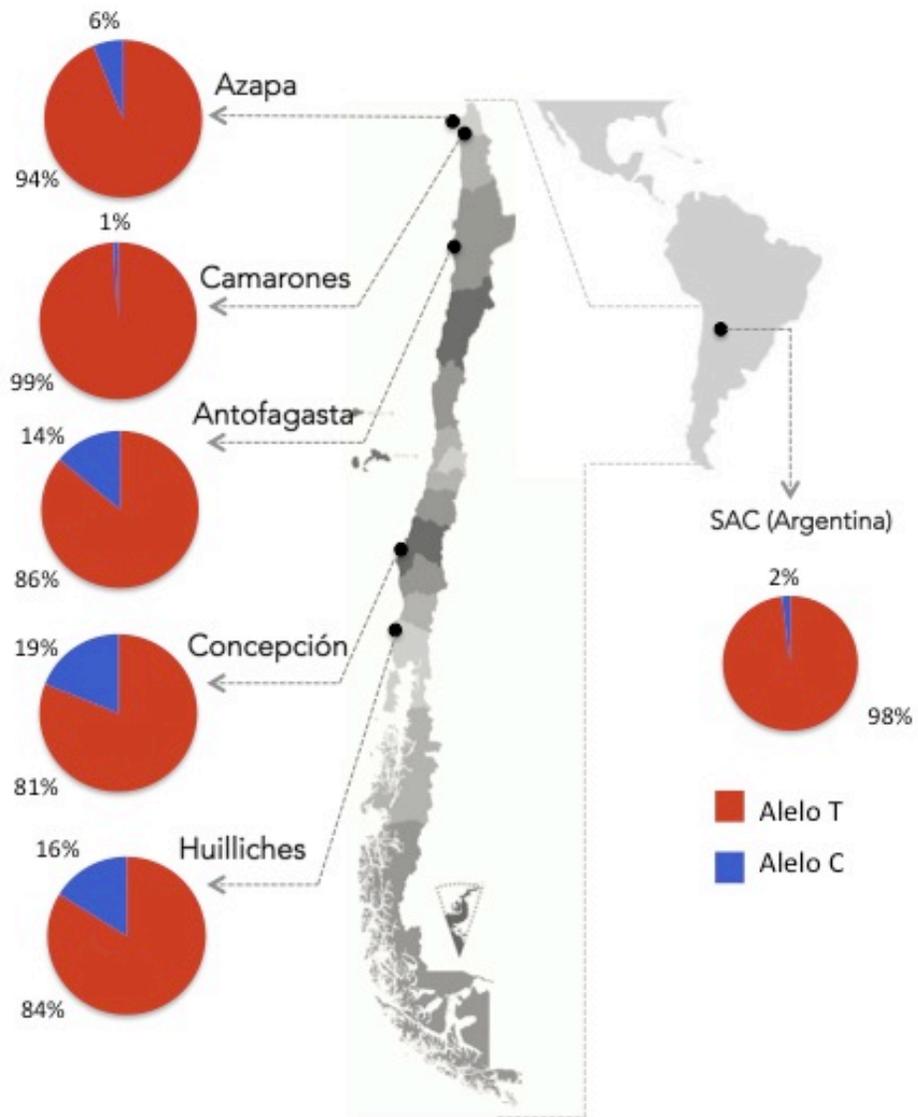
(Meza et al., 2004), Antofagasta (Hernandez et al., 2008a), y de las poblaciones estudiadas en esta memoria (Huilliches y Concepción).

Por otra parte, en la Figura 12 mostramos como se distribuyen las frecuencias génicas del SNP 14458 en cinco poblaciones de Chile. Las poblaciones consideradas, fueron las reportadas en esta memoria: Camarones (n=50), Azapa (n=47), Concepción (n=50) y Huilliches (n=45), e incluimos una muestra de Antofagasta (n=50), previamente reportada (Hernández et al. 2008a). El alelo de toxicidad C, posee su menor frecuencia en Camarones, donde alcanza una frecuencia del 1%. Desde Camarones, observamos un leve aumento de la variante hacia el norte, alcanzando un 6% en el valle de Azapa. Mientras que hacia al sur de Camarones, el alelo C se encuentra con mayores frecuencias, con un 14% en Antofagasta, 19% en Concepción y un 16% en Huilliches. Por último, Camarones se diferencia significativamente ( $P < 0.05$ ), a nivel de frecuencias génicas, con todas las poblaciones ubicadas al sur (Antofagasta, Concepción y Huilliches).

**Tabla 22.** Matriz de comparaciones pareadas de Fst para el SNP 14458 (Met<sup>287</sup>Thr) entre poblaciones expuestas al arsénico

	CAM Local	AZP Local	CON	HUI	ANT	SAC	MEXSL	MEXCL	BAN	BAN2	EUR
CAM Local	0	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
AZP Local	0,06382	0	+	-	-	+	-	-	-	-	-
CON	0,27869	0,12357	0	-	+	+	+	+	+	+	+
HUI	0,25827	0,10126	0,00101	0	-	+	+	-	+	+	-
ANT	0,1026	0,01472	0,08037	0,05985	0	+	-	-	+	+	-
SAC	0,00389	0,10885	0,43357	0,41	0,15351	0	-	+	+	+	+
MEXSL	0,0207	0,00919	0,2134	0,18918	0,05565	0,03765	0	-	-	-	+
MEXCL	0,07912	0	0,1145	0,0915	0,01489	0,12834	0,03108	0	-	-	-
BAN	0,04269	0,00477	0,22489	0,19129	0,0447	0,05814	0,01529	0,02168	0	-	+
BAN2	0,03634	0,00856	0,27023	0,23188	0,05865	0,04757	0,01328	0,02907	0,01958	0	+
EUR	0,10592	0,01766	0,07056	0,05078	0,01666	0,13226	0,06427	0,02251	0,05421	0,07004	0

Figura 12. Variación de las frecuencias génicas del SNP 14458 en cinco poblaciones de Chile.



#### 7.4. Asociación con Variables de la Encuesta

Nuestra principal asociación entre la encuesta y los genotipos, fue mediante la relación entre la distinción de locales y foráneos. Sin embargo, esta categorización no logró diferencias significativas en la frecuencia de los genotipos. Por otra parte, otras variables no poseían un tamaño (*N*) suficiente para generar submuestras que permitiesen comparar y diferenciar significativamente la distribución de genotipos. No obstante, y con el objetivo de ahondar aún más en el origen como un factor de diferenciación, hicimos el ejercicio de agrupar los genotipos de acuerdo al principal grupo étnico de las poblaciones representadas. De forma de conocer si la categoría de Aymaras, diferencia significativamente a Camarones de Azapa a partir de sus genotipos (Tabla 23.). Pero nuevamente las diferencias entre las frecuencias de los genotipos de cada polimorfismos no fueron estadísticamente significativas (Test exacto de Fisher, con  $P < 0.05$ ).

**Tabla 22.** Frecuencia de genotipos de Aymaras (AYM) en Camarones y Azapa

Muestras	SNP 12390			SNP 14215			SNP 35991		
	GG	GC	CC	CC	CT	TT	GG	GA	AA
CAM	0.10	0.45	0.43	0.10	0.36	0.52	0.06	0.45	0.48
AYM	(5)	(21)	(20)	(5)	(17)	(24)	(3)	(21)	(22)
AZP	0.15	0.40	0.45	0.15	0.40	0.45	0.15	0.30	0.55
AYM	(3)	(8)	(9)	(3)	(8)	(9)	(3)	(6)	(11)

## 8. Prueba de Hipótesis

Nuestra hipótesis establecía que las frecuencias genotípicas de las variantes protectoras del gen AS3MT son mayores significativamente en los individuos de origen local de Quebrada Camarones, en comparación con los de una muestra control (valle de Azapa). Para ello realizamos una prueba de homogeneidad con el Test exacto de Fisher, para contrastar nuestra hipótesis. Sin embargo, y tal como ha quedado demostrado en los resultados, las diferencias genotípicas entre los individuos locales de cada valle no fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), por lo que aún no existe evidencia suficiente para rechazar nuestra hipótesis de homogeneidad entre la población de Camarones y el control (Azapa). En este sentido, en la siguiente sección discutiremos en torno a qué elementos pueden estar implícitos en la menor diferenciación de ambos valles (Camarones y Azapa).

## 9. Discusión

Nuestros resultados muestran que la población local de Quebrada Camarones posee la mayor frecuencia de las variantes protectoras en el gen AS3MT. Sin embargo, las diferencias con la población del Valle de Azapa fueron menores (aproximadamente del 10%), y no resultaron ser estadísticamente significativas. Respecto a las mayores frecuencias de las variantes protectoras en los individuos de origen local de Quebrada Camarones, y la interacción de esta población con un medio ambiente extremadamente adverso, nos conduce a discutir sobre una posible adaptación humana al hidroarsenicismo. A su vez, la menor diferenciación entre los valles de Camarones y Azapa, contribuye a una aproximación más amplia sobre la interacción humano-ambiente, integrando elementos genéticos, históricos y culturales de la región.

### 9.1 Adaptación Humana al Hidroarsenicismo

Los efectos del arsénico sobre las poblaciones humanas son extremadamente nocivos para su reproducción y subsistencia. Por lo tanto, una adaptación humana a ambientes tóxicos por arsénico, puede ser el mecanismo con el cual las poblaciones locales de Camarones han logrado sobrevivir. Elementos que contribuyen a esta idea son: 1) los altos niveles de arsénico de ríos y pozos de la región; 2) la temprana ocupación humana (~9000 A.P.); y 3) la fuerte y permanente presión ambiental que ha significado consumir aguas contaminadas con arsénico, dado lo vital de este recurso en el árido desierto de Atacama. Estos elementos, son reforzados con las altas frecuencias de las variantes protectoras del gen AS3MT, encontradas en individuos locales de la región. Dichas frecuencias, podrían haber sido fijadas por los efectos de la selección natural de variantes que

permitan una eficiente metabolización del arsénico (altos %DMA), sin riesgo de efectos tóxicos asociados.

Respecto a los efectos de la selección sobre poblaciones expuestas al hidroarsenicismo, se han señalado fuertemente como candidatas algunas variantes de los SNPs 14458 y 12390 del gen AS3MT, las que han sido asociadas con diferentes patrones de metilación, contribuyendo a un alto porcentaje en la orina de MMA (>25%) y DMA (>70%), respectivamente (Agusa et al., 2011; Sumi & Himeno et al., 2012). El SNP 12390, muestra estar ligado con otros polimorfismos relativamente cercanos del gen AS3MT, como son los SNPs 14215 y 35991, y juntos conforman el haplotipo protector CTA encontrado con alta frecuencia en la población de San Antonio de los Cobres (Argentina), expuesta a 200 µg/L de arsénico en el agua (Schelebusch et al. 2013). La alta frecuencia de este haplotipo resulta relevante, debido a que cuando la selección opera sobre un determinado locus, también lo hace en los loci cercanos a este, fijando el locus específico y loci ligados (en forma de haplotipos), constituyendo una señal clásica para evaluar selección. En este sentido, es interesante observar la alta frecuencia del haplotipo protector en la población de Camarones (CTA=68%), cuya exposición al arsénico es mayor (1000 µg/L) a la presente en la población de Argentina. En el caso de las variantes que conforman el haplotipo CTA, todas están ubicadas en regiones intrónicas, por lo que podrían no afectar directamente la actividad enzimática. No obstante, desde una perspectiva selectiva, puede ser que la selección haya actuado sobre otras variantes ubicadas en exones cercanos, cuya variación si afectaría la actividad de la AS3MT, y que la alta frecuencia del haplotipo protector sea una señal de dicho proceso.

Eventos de selección han ocurrido a lo largo de nuestra macro-evolución, sin embargo, en lo que respecta a los últimos 200.000 años, desde nuestra salida de África, son pocos los casos que se han reportado (Jeong & Di Rienzo, 2014). Una recurrente explicación, alude a que los procesos evolutivos como la selección requieren un amplio tiempo para lograr la fijación de variantes ventajosas en un determinado ambiente. Sin embargo, el caso de la persistencia de la lactasa, resulta ser un ejemplo extraordinario de selección natural reciente (~9000 A.P.), pues entrega un rango de tiempo similar a la temprana exposición humana al arsénico en la región de Arica y Parinacota (~9000 - 7000 a. C.).

## 9.2 Interacción entre Poblaciones Humanas y Arsénico

La interacción entre poblaciones humanas y arsénico, ha mostrado ser distinta en diferentes regiones del mundo. Por una parte, encontramos poblaciones andinas con una exposición milenaria en América, mientras que poblaciones del sudeste asiático poseen una tiempo de exposición más reciente. Destacamos ambas zonas geográficas, por poseer fuertes evidencias de exposición al arsénico, debido a que ambas comparten el cinturón de fuego del Pacífico, lo que contribuye a que sus borde costero posea altos niveles de arsénico en su recursos hídricos (Bundschuh et al., 2012; López et al., 2012).

Las diferencias en el tiempo de exposición, pueden relacionarse con diferentes contextos ambientales, pues en el caso de América los recursos hídricos resultan ser esenciales para la subsistencia. Bajo esta perspectiva, la interacción con el arsénico en las poblaciones asiáticas se ha acentuado recientemente (década de los 70's), al intensificar la extracción de aguas de pozos con compuestos de arsénico más nocivos ( $As^{III}$ ) provocando importantes efectos nocivos sobre la población, como por ejemplo lesiones a la piel, altas tasas de

abortos, y cáncer en órganos de la vía hepática (Pierce et al., 2012; McClintock et al., 2012; Saint Jaques et al., 2014). Por el contrario, poblaciones presuntamente con una milenaria exposición, como son Camarones y San Antonio de los Cobres (Argentina), no evidencian dichos signos patológicos. Esta última diferencia, puede ser relacionada con nuestros resultados de mayores frecuencias de genotipos protectores en Camarones versus la altas frecuencias de las variantes no-protectoras del gen AS3MT en las poblaciones asiáticas. Por otra parte, los efectos tóxicos del arsénico sobre las poblaciones asiáticas, puede estar relacionada con la variación genotípica del SNP 14458, donde encontramos una mayor frecuencia de genotipos de toxicidad en Bangladesh (TC+CC: 11%), versus la casi inexistencia en Camarones (TC: 1%). Por lo tanto, diferencias observadas en el tiempo de exposición pueden ser reflejadas a nivel de genotipos con variantes protectoras que conforman el haplotipo CTA, y con genotipos de toxicidad del SNP 14458, contribuyendo ambas a que las poblaciones andinas no estén sufriendo efectos tóxicos asociados al arsénico.

Otra perspectiva que permite contextualizar la fuerte presión selectiva que pudo significar beber aguas contaminadas con arsénico en América, es en torno al poblamiento temprano de los primeros grupos humanos que ocuparon la zona de los Andes Centro-Sur (Sur del Perú, Norte de Chile y Noroeste de Argentina). Dichos grupos no sólo enfrentaron ambientes adversos como la extrema aridez y alta radiación UV en la costa, o el extremo frío e hipoxia del altiplano, sino además los altos niveles de arsénico distribuidos en sus principales recursos hídricos (López et al. 2012; Figueroa, L., 2001). La región de Arica y Parinacota, posee las evidencias más tempranas de interacción humana con el hidroarsenicismo, principalmente vistas en la cultura Chinchorro (~7000 a.C.). Del poblamiento y el origen biológico de los chinchorros se han propuesto dos rutas de poblamiento

para la región, una de origen costero y otra altiplánica. Estas rutas podrían entregar un contexto más amplio del proceso selectivo de las variantes protectoras del gen AS3MT. En primer lugar, una ruta costera de poblamiento (borde occidental de Sudamérica) contribuye a que la presión selectiva, haya ido ocurriendo previamente a la ocupación de la región (principalmente en zonas de Colombia o Perú), y que el proceso selectivo sólo se haya acentuado más en los valles costeros donde habitaron los chinchorros (Azapa y Camarones). Siendo muchos ambientes costeros más tóxicos que los de valles o altiplánicos (p. Ej. Desembocadura de Camarones con 1300 µg/L).

Otra posibilidad, es el poblamiento a través de una ruta altiplánica, donde los niveles de arsénico también son altos (700-1000 µg/L), por lo que la presión selectiva también podría haber ocurrido allí. Sin embargo aun son pocas las evidencias arqueológicas de ocupación humana continua en ambientes de altura para la región y en la zona andina en general (10.000-9.000 a.C.). Por lo cual, resulta difícil conocer más sobre la interacción entre poblaciones humanas con los recursos ambientales disponibles en la altura, y en particular con ríos o pozos contaminados con arsénico. En síntesis, si bien el poblamiento de la región pudo tener diferentes rutas, lo más probable es que la presión selectiva se haya visto acentuada por las extremas condiciones de esta región, y en particular por el arsénico. Sin embargo, también es necesario revisar algunos elementos de la estructura genética de las poblaciones originaria y actuales de la región, de forma de conocer características culturales y/o biológicas que aporten a comprender la alta frecuencia de variantes asociadas a eficiente metabolización en las poblaciones de Azapa y Camarones.

### 9.3 Estructura genética de Camarones y Azapa

Nuestros resultados muestran pocas diferencias entre individuos locales de cada valle (Azapa y Camarones) a nivel de sus genotipos protectores para el arsénico. Estos resultados pueden ser complementados con una aproximación a su estructura genética respectiva, medida por marcadores del ADN mitocondrial y del Cromosoma Y. Ambos marcadores muestran que la población de Camarones y Azapa poseen un fuerte componente de linajes originarios americanos. Sin embargo, la distribución y presencia de algunos marcadores generan importantes diferencias entre dichos valles. En primer lugar, a nivel de haplogrupos mitocondriales, el componente nativo americano es mayor en Camarones que en Azapa, debido a que sólo encontramos haplogrupos B, C y D. Además, Camarones se destaca por una alta frecuencia de B (70%), que es muy similar a las poblaciones aymaras del altiplano andino. Mientras que en Azapa observamos una mayor diversidad, pues encontramos el haplogrupo A (8%) y otros de tipo no-americanos (6%). A estas diferencias debemos sumar que la población de Azapa, posee una mayor inclusión de linajes paternos europeos del cromosoma Y (haplogrupos R, K, e I), mientras que Camarones posee un mayor porcentaje de linajes americanos (haplogrupo Q-M3). Por último, los STRs utilizados en individuos portadores del haplogrupo Q-M3, también logran mostrar diferencias entre ambos valles, pues Azapa pareciera estar más cercano a individuos nativos costeros del sur de Chile, mientras que Camarones lo esta de individuos aymaras y atacameños del altiplano. La distinción entre poblaciones de ambos valles de la región de Arica y Parínacota, enriquece nuestra discusión en torno a una posible adaptación al hidroarsenicismo, debido a que nos puede estar señalando que variantes genéticas protectoras del gen AS3MT, están en altas frecuencias en

poblaciones con diferente estructura poblacional, pero que comparten un similar ambiente tóxico.

## 10. Conclusión

Podemos concluir que existe una alta frecuencia de variantes protectoras del gen AS3MT asociadas a las poblaciones locales e históricamente expuestas al hidroarsenicismo de los valles de Azapa y Camarones (región de Arica y Parinacota). Estos resultados, sugieren que ambas poblaciones nortinas poseen una alta capacidad metabolizadora del arsénico. Mientras que, poblaciones urbanas y originarias del sur de Chile que consumen aguas con niveles de arsénico bajo la norma, poseen una mayor frecuencia de variantes no-protectoras, sugiriendo entonces que en las poblaciones nortinas bajo la permanente exposición a altos niveles de arsénico en el agua, se habrían seleccionado variantes genéticas ventajosas asociadas a un metabolismo eficiente del arsénico, lo que contribuido a la subsistencia en un ambiente altamente adverso.

## 11. Bibliografía

1. Agusa T., Fujihara J., Takeshita H., Ylwata H. 2011. Individual Variation in Inorganic Arsenic Metabolism Associated with AS3MT Genetic Polymorphisms. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 2351-2382.
2. Antonelli R., Shao K., Thomas D.J., Sams Ilc R., Cowden J. 2014. AS3MT, GSTO, and PNP polymorphisms: Impact on arsenic methylation and implications for disease susceptibility. *Environmental Research* 132 (2014) 156–167.
3. Arriaza B.T. 2005a. An environmental hypothesis to explain the origin of Chinchorro artificial mummification. *Chungará*; 37: 2: 255-60.
4. Arriaza B.T. 2005b. *Cultura Chinchorro: las Momias más Antiguas del Mundo*. Editorial Universitaria. Santiago de Chile.
5. Arriaza B., Dula Amarasiriwardena, Cornejo L., Standen V., Byrne S., Bartkus L., Basel B. 2010. Exploring chronic arsenic poisoning in pre-Columbian Chilean mummies. *Journal of Archeological Sciences* vol. 37: 1274–1278.
6. Arriaza B. & Standen V. 2008. *Bioarqueología. Historia Biocultural de los Antiguos Pobladores del Extremo Norte de Chile*. Editorial Universitaria. Santiago de Chile.
7. Bartkus L., Amarasiriwardena D., Arriaza B., Bellis D., Yáñez J. 2011. Exploring lead exposure in ancient Chilean mummies using a single strand of hair by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchemical Journal* 98: 267-274.
8. Boston C.E. y Arriaza B.T. 2006. Arseniasis and Teratogenic Anomalies in the Atacama Desert Coast of Ancient Chile. *Interciencia* vol. 34(5): 338-343.

9. Bundschuh J., Litter M.L, Parvez F., Román-Ross G., Nicolli H.B., Jean J-S., Liu C-W., López D., Armienta M.A., Guilherme L R.G., Gómez A., Cornejo L., Cumbal L., Toujaguez R. 2012. One century of arsenic in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment* 429: 2–35.
10. Cornejo-Ponce L., Lienqueo H., Arriaza B.T. 2011. Levels of total arsenic in edible fish and shellfish obtained from two coastal sectors of the Atacama Desert in north of Chile: Use of non-migratory marine species as bioindicators of sea environmental pollution. *Journal of Environmental Sciences Health, part A* 46:1274-1282.
11. DEIS-MINSAL 2010a. Mortalidad Infantil (fetal, neonates, y niños). En: <http://www.deis.cl/estadisticas-mortalidad/> [visto el Lunes 15/07/2013 a las 13:24 hrs.]; [http://deis.minsal.cl/vitales/mortalidad\\_infantil/tree.aspx](http://deis.minsal.cl/vitales/mortalidad_infantil/tree.aspx) [visto el Lunes 15/07/2013, a las 13: 30 hrs]; [http://deis.minsal.cl/vitales/mortalidad\\_fetal/tree.aspx](http://deis.minsal.cl/vitales/mortalidad_fetal/tree.aspx) [Visto el Lunes 15/07/2013, a las 13:35 hrs.].
12. DEIS-MINSAL 2010b. Mortalidad por causa de muerte, por Región, gran grupo de causas de muerte, 2010. En: <http://www.deis.cl/estadisticas-mortalidad/> [Visto el Lunes 15/07/2013, a las 13:24 hrs.].
13. DEIS-MINSAL 2010c. Mortalidad por causas, según sexo, región de Arica y Parinacota, entre el 2000-2010. En: [http://deis.minsal.cl/vitales/vitales2010/Serie\\_Mortalidad\\_causa\\_Chile\\_2000\\_2010/Arica\\_Parinacota.htm](http://deis.minsal.cl/vitales/vitales2010/Serie_Mortalidad_causa_Chile_2000_2010/Arica_Parinacota.htm) [Visto el Lunes 15/07/2013, a las 14:00hrs]
14. De Saint Pierre M., Bravi C., Motti M.B., Fuku N., Tanaka, Llop E., Bonatto S.L., Moraga M., 2012. An Alternative Model for the early Peopling of

- Southern South America Revealed By Analyses of three Mitochondrial DNA Haplogroup. Plos One 7(9): e43486.
15. Engström K., Broeberg K., Concha G., Vahter M., Malakar S.J., *et al.* 2007. Genetic Polymorphisms influencing arsenic metabolism: evidences from Argentina. *Environ Health Perspect.* 115: 559-605.
  16. Engström K, Vahter M, Mlakar SJ, Concha G, Nermell B, RaqibR, Cardozo A, Broberg K. 2011. Polymorphisms in arsenic (+III oxidationstate) methyltransferase (AS3MT) predict gene expression of AS3MT as well as arsenic metabolism. *Environ. Health Perspect.* 119: 182–188.
  17. Engström KS, Hossain MB, Lauss M, Ahmed S, Raqib R, *et al.* 2013. Efficient Arsenic Metabolism —The AS3MT Haplotype Is Associated with DNA Methylation and Expression of Multiple Genes Around AS3MT. *PLoS ONE* 8(1): e53732.
  18. Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1: 47-50.
  19. Ferrecio, C. y Sancha, A.M. 2006. Arsenic Exposure and its impact on health in Chile. *J. Health Popul Nutr* 24 (2): 164-175.
  20. Figueroa L., Razmilic B., Allison M., González M. 1988. Evidencias de Arsenicismo Crónico en Momias del Valle de Camarones. *Chungara* 21: 33-42.
  21. Figueroa L. 2001. Arica inserta en una region arsenical: El arsénico en el ambiente que la afecta y sus 45 siglos de arsenicismo crónico. Ediciones Universidad de Tarapacá.
  22. Fujihara, J., Kunito, T., Agusa, T., Yasuda, T., Iida, R., Takeshita, H., 2007a. Population differences in the human arsenic methyltransferase (AS3MT)

- gene polymorphism detected by using genotyping method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 225: 251–254.
23. Fujihara, J., Soejima, M., Koda, Y., Kunito, T., Takeshita, H., 2008. Asian specific low mutation frequencies of the M287T polymorphism in the human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) gene. *Mutat. Res.* 654: 158–161.
24. Fujihara, J., Fujii, Y., Agusa, T., Kunito, T., Yasuda, T., Takeshita, H., 2009. Ethnic differences in five intronic polymorphisms associated with arsenic metabolism within human arsenic (+3oxidation state) methyltransferase (AS3MT) gene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234: 41–46.
25. Fujihara, J.; Soejima, M.; Yasuda, T.; Koda, Y.; Agusa, T.; Kunito, T.; Tongu, M.; Yamada, T.; Takeshita, H. 2010 Global analysis of genetic variation in human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT). *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 243: 292–299.
26. Hernández A., Ximena N., Surralles J., Sekaran C., Tokunaga H., Quinteros D., Creus A., Marcos R. 2008a. Role of the Met(287)Thr polymorphism in the AS3MT gene on the metabolic arsenic profile. *Mutat. Res.* 637: 80-92.
27. Hernández A., Sekaran C., Tokunaga H., Sampayo-Reyes A., D., Creus A., Marcos R. et al. 2008b. High arsenic metabolic efficiency in AS3MT Met(287)Thr allele carriers. *Pharmacogenet.Genomics.* 18: 349-355.
28. Hindmarsh, J.T. Caveats in hair analysis in chronic hair poisoning. *Clin. Biochem.* 35: 1-11.
29. Hopenhayn-Rich C., Browning S., Hertz-Picciotto I., Ferreccio C., Peralta C., Gibb H. 2000. Chronic arsenic exposure and risk of infant mortality in two areas of Chile. *Environ Health Perspect*; 108: 667-73.

30. Hopenhayn C, Ferreccio C, Browning SR, Huang B, Peralta C, Gibb H, et al. 2003. Arsenic exposure from drinking water and birth weight. *Epidemiology*; 14: 593-602
31. Hsu L., Chen G.S., Lee C.H., Yang T.S., Chen Y.H., Wang Y.H., Hsueh Y.M., Chiou H.Y., Wu M.M., and Chen C.J.. 2013. Use of Arsenic-Induced Palmoplantar Hyperkeratosis and Skin Cancers to Predict Risk of Subsequent Internal Malignancy. *Am. J. Epidemiol.* 177: 202-212.
32. Hughes M.F., Beck B.D., Chen Y., Lewis A.S., Thomas D.J. 2011. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicological Sciences* 132(2): 305-332.
33. INE 2002a. Estadística de los Pueblos Indígenas de Chile. INE. Santiago de Chile.
34. INE 2012b. Estadísticas Demográficas. Compendio 2012. Santiago de Chile.
35. Lin, Shi Q, Nix FB, Styblo M, Beck MA, Herbin-Davis KM, et al. 2002. A novel S-adenosyl-l-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem* 277:10795–10803.
36. Lindberg, A.L., Kumar, R., Goessler, W., Thirumaran, R., Gurzau, E., Koppova, K., Rudnai, P., Leonardi, G., Fletcher, T., Vahter, M., 2007. Metabolism of low-dose inorganic arsenic in a central European population: influence of sex and genetic polymorphisms. *Environ. Health Perspect.* 115: 1081–1086.
37. Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J., Kligerman, A.D., 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 355–361.

38. Meza, M.M., Kopplin, M.J., Burguess, J.L., Gandolfi, A.J., 2004. Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico. *Environ. Res.* 96: 119-126.
39. Meza, M.M., Gandolfi, A.J., Klimecki, W.T., 2007. Developmental and genetic modulation of arsenic biotransformation: a gene by environmental interaction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222: 381–387.
40. Moraga M., Santoro C., Standen V., Carvallo P., Rothhammer F. 2006. Microevolution in Prehistoric in Andean Populations: Chronologic mtDNA Variation in the Desert Valleys of Northern of Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.* 127: 170-181.
41. Moraga, M., P. Rocco, J. Miquel, F. Nervi, E. Llop, R. Chakraborty, F. Rothhammer y P. Carvallo. 2000. Mitochondrial DNA Polymorphisms in Chilean Aboriginal Populations: Implications for the Peopling of the Southern Cone of the Continent. *Am. J. Phys. Anthropol.* 113: 19-29.
42. Moraga, M., E. Aspillaga, C. Santoro, V. Standen, P. Carvallo y F. Rothhammer. 2001. Análisis de ADN mitocondrial en momias del Norte de Chile avala hipótesis de origen amazónico de poblaciones andinas. *Rev. Ch. Hist. Nat.* 74: 719-726.
43. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2006. Guías para la calidad del agua potable [recurso electrónico]: incluye el primer apéndice. Tercera edición (vol. 1): 250. En:  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf)
44. Pierce BL, Kibriya MG, Tong L, Jasmine F, Argos M, et al. (2012) Genome-Wide Association Study Identifies Chromosome 10q24.32 Variants Associated with Arsenic Metabolism and Toxicity Phenotypes in Bangladesh. *PLoS Genet* 8(2): e1002522.

45. Quinque D., Kittler R., Kayser M., Stoneking M., Nasidze I. 2006. Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. *Analytical Biochemistry* 353(2): 272-7.
46. Rothhammer F., Moraga M., Santoro C., Arriaza B., 2010. Origen de los Changos. Análisis de ADNmt antiguo sugiere descendencia de pescadores de la cultura Chinchorro (7900-4000 A.P.). *Rev. Med. Chile.* 138, 251-256.
47. Santoro C., Rivadeneira M.M. Latorre C., Rothhammer F., Standen V. Rise and Decline of Chinchorro Sacred Landscape Along the Hyperarid
48. Schlebusch C.M., et al. 2013. Possible Positive Selection for an Arsenic-Protective Haplotype in Humans. *Environ. Health Perspect.* 121 (1): 53-58.
49. Silva Pinto V., Arriaza B., Standen V. 2010a. Evaluación de la espina bifida oculta y su posible relación con el arsenic ambiental en una muestra prehispánica de Quebrada Camarones. Norte de Chile. *Rev. med. Chile v.* 138 (4): 461-469.
50. Silva Pinto, V. 2010b. Evaluación paleo epidemiológica de la frecuencia de espina bífida oculta y su posible relación con el arsenic ambiental en la quebrada de Camarones (Norte de Chile). Disponible en: <http://tesis.uchile.cl/handle/2250/106292>
51. Schull William J. & Rothhammer, F. 1990. *The Aymara: Strategies in Human Adaptation to Rigorous Environment.* Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
52. Sumi D. y Himeno S. 2012. Role of Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferasa in Arsenic Metabolism and Toxicity. *Biol. Pharm. Bull.* 35(11): 1870-1875
53. Taucher E. 1997. *Bioestadística.* 2º Edición. Editorial Universitaria S.A. Chile.

54. Thomas D.J. *et al.* 2007. Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferasa and methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med.* 232: 3-13.
55. Tseng, Chin-Hsiao. 2009. A review on environmental factors regulating arsenic methylation in humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* 235: 338-350.
56. Vahter, M., 2000. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic and its role in toxicity. *Toxicol. Lett.* 112-113: 209–217.
57. Warner, M.L., Moore, L.E., Smith, M.T., Kalman, D.A., Fanning, E., Smith, A.H. 1994. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3: 583-590.
58. Yáñez J., Fierro V., Mansilla H., Figueroa L., Cornejo L., Barnes R.M. 2005. Arsenic speciation in human hair: a new perspective for epidemiological assessment in chronic arsenicism. *J. Environ. Monit.* 7: 1335-1341.

## 12. Anexos

### Anexo 1. Consentimiento Informado elaborado para esta memoria.

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO (Forma B)



11 NOV. 2013

**NOMBRE DEL PROYECTO:** "Señales de adaptación humana al arsénico: Posible relación entre la población local de los valles interiores de Arica y Parínacota, con marcadores genéticos (SNPs) de eficiente metabolización, presentes en el gen AS3MT"

**INVESTIGADOR (ES) RESPONSABLE (S):** Dr. Mauricio Moraga

**COINVESTIGADOR:** Mario Andrés Apata Mamani.

**INSTITUCIÓN PRINCIPAL:** Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Estamos invitando a usted y a otras personas de su localidad a participar de un proyecto de investigación científica que permitirá entender mejor el origen y la evolución de las poblaciones originarias del extremo norte de Chile. Para realizar este estudio requerimos de su colaboración voluntaria, usted es libre de participar o no del estudio.

Todas las personas recibimos de nuestros padres la información genética que determina nuestro aspecto físico y otras características individuales como por ejemplo el color del pelo y de los ojos. Esta información es transmitida por una molécula muy pequeña, el ADN que pasa de padres y madres hacia los hijos. Para conocer la información genética de nuestros ancestros, estudiaremos el ADN de los individuos de su localidad.

Los estudios científicos muestran que todos los pueblos originarios americanos provienen de poblaciones que viajaron desde Asia hace miles de años atrás. Desde ese tiempo dichas poblaciones se distribuyeron a lo largo de nuestro territorio ocupando los diferentes ambientes desde el árido norte hasta el frío y lluvioso sur, diferenciándose en las distintas etnias originarias que conocemos. Además, este proceso implicó la adaptación a condiciones extremas como la falta de oxígeno en el altiplano andino.

La XV región de Arica y Parínacota, ubicada en el extremo norte de Chile, posee una diversidad de ambientes que permitieron el asentamiento temprano de personas tanto en el altiplano como en la costa, manteniendo una ocupación hasta la actualidad. Sin embargo, algunas condiciones de este territorio, como son los altos niveles de arsénico en los ríos y pozos de la zona, podrían haber sido perjudiciales para la subsistencia de nuestros ancestros. En base a dicha permanencia, es que nuestro proyecto **busca determinar un posible efecto adaptativo, como resultado del consumo constante de aguas con altos niveles de arsénico, entre las personas que habitaron en el pasado las diferentes localidades de la XV región.** Para ello se comparará la frecuencia de algunos marcadores genéticos con la determinada para otras poblaciones ancestrales y rurales expuestas a mínimas concentraciones de arsénico en el agua de la región.

Si usted acepta participar, se le solicitará que responda una breve encuesta respecto a su origen y el de sus padres, además se le pedirá que nos de aproximadamente 2 ml de saliva, para lo cual tendrá que escupir en un tubo estéril. Este procedimiento no reviste ningún riesgo ni molestia para usted. Todo el procedimiento incluyendo la encuesta no le tomará más de veinte minutos.

Hoja 1 de 2



11 NOV. 2013

Su participación es voluntaria, y usted puede elegir retirarse en cualquier momento del estudio, poniéndose en contacto con el investigador responsable en la dirección, el teléfono o el e-mail indicados en este documento, de ser así la muestra será destruida a petición suya. Su participación en este proyecto no implica riesgos ni beneficios directos para usted.

Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada con estricta confidencialidad. De generarse publicaciones o comunicaciones científicas de los resultados de este estudio, estas serán completamente anónimas. En el caso de requerirlo usted podrá solicitar se le entregue la información particular de sus análisis, comprometiéndose el investigador a explicarle tales resultados en el contexto de la información general. Las muestras de ADN se guardarán con un código propio y quedarán en custodia en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución Humana, Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile bajo la responsabilidad de Dr. Mauricio Moraga, hasta que se cumplan todos los objetivos del proyecto o los que puedan derivar del desarrollo de éste. En caso de querer incluirlas en un futuro estudio de similares características lo contactaremos para solicitarle su consentimiento. Sólo el investigador responsable tendrá acceso a la información personal y la relación entre el código de muestras y los nombres de los participantes.

Si requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con: Dr. Mauricio Moraga, Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile fono: 29786599, correo: mmoraga@med.uchile.cl.

En caso que usted no esté conforme con el proceder de los investigadores puede contactarse con: Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Fono: 29786923, correo: ceiha@med.uchile.cl.

Después de haber recibido y comprendido la información contenida en este documento y de haber aclarado todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en este estudio.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante

\_\_\_\_\_  
Firma  
(o huella dactilar)

\_\_\_\_\_  
Nombre del Informante

\_\_\_\_\_  
Firma

*Mauricio Moraga V.*  
\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador

\_\_\_\_\_  
Firma

Fecha: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## Anexo 2

### ENCUESTA

Nº Cuestionario: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2013

Sexo: \_\_\_\_M \_\_\_\_F

Edad: \_\_\_\_\_

Nacionalidad: \_\_\_\_\_

Localidad Específica: \_\_\_\_\_. Comuna: \_\_\_\_\_, XV región

- I. Las siguientes preguntas tienen por objetivo caracterizar la residencia y permanencia de la población que habita en los valles interiores de la XV región:

1. Señale cuál fue su lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_,  
e indique la comuna en que se encuentra:

- a) Arica
- b) Parínacota
- c) Camarones
- d) Otra: \_\_\_\_\_

2. Durante los últimos 12 meses, en qué lugar reside usted: \_\_\_\_\_,  
e indique la comuna en que se encuentra:

- a) Arica
- b) Parínacota
- c) Camarones
- d) Otra: \_\_\_\_\_

3. Según su **historia familiar**, cuántas generaciones han vivido en esta localidad:

- a) 1 generación (sólo usted)
- b) 2 generaciones (usted y sus padres)
- c) 3 generaciones (usted, sus padres y abuelos)
- d) Siempre han vivido aquí (+ de 3 generaciones)
- e) No posee historia familiar en esta zona

4. Respecto a su localidad de origen, y según su historia familiar, señale qué tipo de residente se considera allí:

a) Local, si su familia siempre ha vivido allí (o al menos dos generaciones)

b) Foráneo, si usted proviene de otra comuna o región

Observaciones:

Respecto a sus padres, señale cuáles son sus apellidos:

5. Apellidos Padre:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6. Apellidos Madre:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

7. Independiente del origen de sus apellidos, cómo se considera usted a sí mismo:

a) Local, con ascendencia étnica

b) Mestizo

c) Chileno, sin ascendencia étnica

d) Extranjero

8. En caso de considerarse como local (con ascendencia étnica) o mestizo, de cuál etnia originaria se considera descendiente:

a) Aymará

b) Quechua

c) Atacameño

d) Diaguita

e) Mapuche

f) Otra: \_\_\_\_\_

Observaciones:

Este apartado tiene como objetivo caracterizar el consumo de fuentes de aguas con altos niveles de arsénico y los factores de riesgo asociados con la exposición al arsénico ambiental.

<p>9. Durante su niñez, ¿cuál era la principal fuente de agua de la que usted bebía?</p> <p>a) Río de la zona b) Pozo c) Agua potable</p> <p>Observaciones:</p>	
<p>10. En la actualidad, ¿cuál es la principal fuente de agua de la que usted bebe?</p> <p>a) Río de la zona b) Pozo c) Agua potable</p> <p>Observaciones:</p>	
<p>Respecto al origen de los <b>principales productos alimenticios</b> que usted consume</p>	
<p>11. Los productos agrícolas como verduras y frutas son:</p> <p>a) producidos en la localidad b) traídos desde otras localidades cercanas c) importados desde alguna ciudad (por ej. envasados de supermercados)</p>	<p>12. De las carnes rojas consumidas como bovinos, caprinos y ovinos, estas son:</p> <p>a) De criaderos en la localidad b) traídos desde otras localidades cercanas c) importados desde alguna ciudad (por ej. envasados de supermercados)</p>

13. Respecto a su dieta, ¿con qué frecuencia consume productos marinos como pescados, mariscos y moluscos durante un mes promedio en el año?

- a) 1 vez al mes
- b) 2 veces al mes
- c) Más de dos veces
- d) Escaso consumo de esos productos durante el año

14. Respecto a su dieta, cuál es la frecuencia con que consume panes y cereales (ricos en ácido fólico) durante una semana, en un mes promedio del año?

- a) A diario [5 a 7 veces por semana]
- b) Poco [entre 4 a 3 veces por semana]
- c) Muy poco [ $\leq$  a 2 veces por la semana]
- d) No consume

15. ¿Realiza alguna de las siguientes actividades laborales?

- a) Extracción minera
- b) Fundición minera
- c) Agricultura con remoción de suelos
- d) Manejo de pesticidas: \_\_\_\_\_
- e) Construcción con remoción de suelos
- f) Otra: \_\_\_\_\_

16. ¿Padece de alguna enfermedad?

- a) Si
- b) No

En caso de ser afirmativa su respuesta, señale cuál es: \_\_\_\_\_,  
o bien, señale si está relacionada con:

- a) Problemas al corazón [Cardiovasculares]
- b) Problemas en los pulmones o al respirar [Respiratorias]
- c) Problemas en sus riñones o al orinar [Renales]
- d) Problemas Inmunológicas
- e) Otros: \_\_\_\_\_

17. ¿A usted se le ha diagnosticado “intoxicación por exposición al arsénico”?

- a) Si
- b) No
- c) Nunca me he hecho ese tipo de exámenes

18. En caso de ser afirmativa su respuesta anterior, ¿ha recibido algún tratamiento médico?

- a) Si
- b) No

19. Indique si usted ha presentado alguno de los siguientes signos y/o enfermedades en su cuerpo:

- a) Manchas en la piel (hiperpigmentación cutánea)
- b) Durezas, callosidades o engrosamientos en la piel (hiperqueratosis cutánea)
- c) Cáncer en la piel
- d) Cáncer en el hígado
- e) Cáncer en el riñón
- f) Cáncer pulmonar
- g) Otros signos/síntomas: \_\_\_\_\_

20. Si usted se reconoció como foráneo de la localidad, desde el momento que reside en esta localidad ha presentado alguno de los siguientes síntomas:

- a) Vómitos, dolor abdominal y diarrea
- b) Entumecimiento u hormigueo en las manos y los pies
- c) Calambres musculares constantes
- d) Ninguna de las anteriores

21. Respecto a su familia ¿Cuánto hijos posee?

- a) 1
- b) 2
- c) Más de dos
- d) No posee hijos

22. ¿Cuántos hermanos posee?

- a) 1
- b) 2
- c) Más de dos
- d) No posee hermanos

23. ¿cuántos tíos posee?

- a) 1
- b) 2
- c) Más de dos
- d) No posee tíos

24. Si usted ha sufrido la lamentable pérdida de alguno de sus hijos a la fecha, ¿Cuál fue el rango de edad en que ocurrió?

- a) Durante el embarazo
- b) Al momento de nacer
- c) a los pocos meses de vida (1-9 meses)
- d) durante la niñez (1 año a 15 años)
- e) en su juventud (15 a 22 años)
- f) en la adultez (mayor a 22 años)

**Muchas gracias por su paciencia y colaboración con la presente investigación.**

### Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de saliva.

