

U. CH-FC
Biotecnología
R 621
C. 1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**ANALISIS DE LA DISTRIBUCION DE HAPLOTIPOS DEL
CROMOSOMA Y, EN POBLACIONES ABORIGENES
CHILENAS Y EN LA POBLACION DE SANTIAGO**

PROFESOR PATROCINANTE:

DR. VÍCTOR CIFUENTES
LABORATORIO DE GENÉTICA
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**PROFESOR DIRECTOR DE
TESIS:**

DRA. PILAR CARVALLO DE S.Q.
LABORATORIO DE GENÉTICA
MOLECULAR HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGICAS
PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA DE CHILE



MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

FRANCISCO JAVIER RIVERA GOMEZ-BARRIS

2002

AGRADECIEMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Pilar Carvallo por su apoyo constante durante el desarrollo de mi trabajo de tesis. También por sus consejos, críticas y su buena disposición que me ayudaron mucho en mi aprendizaje y en mi formación científica.

Agradezco al Dr. Juan Francisco Miquel por su ayuda en la recolección de las muestras y en la entrega de la información necesaria de los habitantes de la Isla Huapi y de la población de Santiago.

A mis compañeros de laboratorio, por los buenos momentos compartidos en el diario vivir. A Marcela Sjöberg por su constante amistad y aporte durante el desarrollo de mi tesis. A Mauricio Moraga por su buenísimo aporte con sus consejos tanto en la parte experimental como en la discusión de este trabajo, además por sus sarcásticos chistes que nos hicieron reír a todos en más de alguna oportunidad. A Carmen Morales por ser una muy buena guía durante el inicio de mi tesis, a Paola Rocco por su gran apoyo y compañerismo, a Paula Faundez por su alegría y buenos chistes. A Loreto Egaña y Marcela Gallardo por su importante colaboración en mis momentos complicados. A Rodrigo Alvarez por su amistad y apoyo en la parte experimental que me significo bastante.

Quiero agradecer especialmente a mis padres por su constante apoyo y dedicación durante no sólo el desarrollo de mi tesis sino también durante el curso de mi carrera. A mi madre, Luz del Valle Gomez-Barris, por el amor entregado y a mi padre, Jorge Rivera, por sus sabios consejos y amplia discusión de mis trabajos. A mi Sensei Raúl Fernandez de la Reguera por su permanente colaboración y gran entrega.

Por último quiero agradecer a mis compañeros y amigos por su constante apoyo y amistad.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	x
INTRODUCCION.....	1
I. Poblamiento Americano.....	2
II. Poblamiento e Historia de la Isla de Pascua.....	3
II. 1. Poblamiento de la Polinesia y la Isla de Pascua.....	3
II. 2. Breve reseña histórica de la Isla de Pascua.....	5
III. Cromosoma Y.....	8
III. 1. Variabilidad en la región específica del cromosoma Y.....	9
III. 2. Loci polimórficos del cromosoma Y.....	9
A. Marcadores Bialélicos.....	11
B. Marcadores Multialélicos.....	14
1. Microsatélites, STR.....	14
2. DNA satélite (α).....	15
III. 3. Haplotipos del cromosoma Y, característicos para diversas poblaciones.....	20

OBJETIVOS.....	22
MATERIALES.....	23
A) Muestras.....	23
B) Reactivos.....	24
METODOS.....	25
I. Obtención del DNA Genómico.....	25
II. Amplificación de DNA por la técnica de PCR.....	25
II.1. Oligonucleótidos.....	25
II.2. Reacción de Amplificación.....	25
III. Digestión con Enzimas de Restricción.....	29
IV. Análisis de los Distintos Marcadores Polimórficos del cromosoma Y.....	30
IV. 1. DYS287.....	30
IV. 2. DYS199.....	30
IV. 3. DYS271.....	34
IV. 4. RPS4Y.....	34
IV. 5. 92R7.....	34
IV. 6. DYS19.....	40
IV. 7. Sistema alfoide (DYZ3).....	42
V. Tinción con Plata.....	44

RESULTADOS.....	45
I. Determinación de Haplotipos del Cromosoma Y; y sus Frecuencias en Poblaciones Aborígenes Chilenas Continentales.....	45
I. 1. Población Yamana.....	45
I. 2. Población Pehuenche.....	46
I. 3. Población Mapuche.....	48
II. Determinación de Haplotipos del Cromosoma Y; y sus Frecuencias en la Población de Santiago.....	50
III. Determinación de Haplotipos del Cromosoma Y; y sus Frecuencias en la Población de la Isla de Pascua.....	53
DISCUSION.....	55
CONCLUSIONES.....	66
REFERENCIAS.....	67

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Vía de migraciones propuesta para el poblamiento de la Polinesia.....	4
FIGURA 2.- Esquema geográfico de la Isla de Pascua.....	7
FIGURA 3.- Marcadores polimórficos para cromosoma Y.....	10
FIGURA 4.- Distribución de los diferentes alelos del marcador microsatélite DYS19 en distintas regiones del mundo.....	16
FIGURA 5.- Sistema alfoide y formación de hetero-dobletes.....	17
FIGURA 6.- Esquema de pares de hetero-doblete (h1, h5, h6, h7, h9).....	19
FIGURA 7.- Análisis del marcador DYS287 (YAP) por electroforesis en gel de agarosa.....	31
FIGURA 8.- Análisis del locus DYS199 por digestión con <i>Mfe I</i>	32-33
FIGURA 9.- Análisis del marcador polimórfico DYS271 por digestión con <i>Nla III</i> ...	36-37
FIGURA 10.- Análisis del marcador Polimórfico RPS4Y por electroforesis en gel de Nusieve- agarosa.....	38
FIGURA 11.- Análisis del marcador polimórfico 92R7 por digestión con <i>Hind III</i> ...	39
FIGURA 12.- Análisis en gel de poliacrilamida para el marcador polimórfico DYS19.....	41
FIGURA 13.- Análisis de los haplotipos del sistema alfoide por electroforesis en gel MDE.....	43
FIGURA 14.- Distribución Materna (a) y Paterna (b) de la Etnicidad de las Poblaciones Aborígenes Chilenas (Mapuches y Pehuenches).....	58
FIGURA 15.- Distribución Materna (a) y Paterna (b) del origen étnico de la población de Santiago.....	61

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.- Muestra los marcadores SNP utilizados en el presente estudio.....	12
TABLA 2.- Partidores utilizados para la amplificación de los distintos marcadores polimórficos del cromosoma Y.....	26
TABLA 3.- Condiciones y programas para PCR de los distintos loci utilizados como marcadores polimórficos en este estudio.....	27
TABLA 4.- Parejas de partidores y tamaños de los amplificadores para cada locus polimórfico del cromosoma Y.....	28
TABLA 5.- Enzimas de restricción utilizadas para el análisis por RFLP en los distintos marcadores polimórficos del tipo SNP estudiados.....	35
TABLA 6.- Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Yamana.....	47
TABLA 7.- Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Pehuenche.....	47
TABLA 8.- Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Mapuche.....	49
TABLA 9.- Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Santiago.....	51
TABLA 10.- Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Isla de Pascua.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

αh	Secuencia alfoide (Alphoid sequence)
dNTP	2' desoxinucleosido-5' trifosfato (2' deoxynucleotide-5' triphosphate)
mtDNA	DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA)
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa (Polymerase chain reaction)
RFLP	Polimorfismo de largo de fragmento de restricción (Restriction fragment length polymorphism)
SINE	Elemento nuclear de secuencia intercalada (Sequence interspersed nuclear element)
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (Single nucleotide polymorphism)
STR	Repetidos cortos s en tandem (Short Tandem Repeat)
VNTR	Número variable de repetidos en tandem (Variable number of tandem repeats)
YAP	Polimorfismo ALU en cromosoma Y (Y chromosome ALU polymorphisms)

RESUMEN

La genética molecular de poblaciones es de gran utilidad en el estudio evolutivo e histórico de las poblaciones humanas, sobre todo gracias al reciente conocimiento aportado por el proyecto del Genoma Humano. La utilización de marcadores genéticos específicos del DNA mitocondrial y del cromosoma Y humano, nos permiten la caracterización genético molecular de poblaciones aborígenes actuales por lado materno y paterno, respectivamente.

El cromosoma Y, presenta dos características que lo convierten en una buena herramienta para los estudios poblacionales. Primero tiene una herencia exclusivamente paterna, y segundo posee secuencias únicas en más del 90% del cromosoma, el cual no sufre recombinación con otros cromosomas. Precisamente es a partir de esta región del cromosoma Y que se escogieron los diferentes loci polimórficos que se utilizarán en este estudio. La combinación alélica de los diferentes marcadores polimórficos dentro del cromosoma Y, determina un haplotipo, el cuál puede ser característico de una determinada etnia, o de una región geográfica que incluya a más de una etnia. De esta manera el haplotipo YAP-/ DYS199T/ DYS271A/ DYS19A,B/ α h II, que involucra 5 loci del cromosoma Y, es reconocido como el haplotipo mayoritario de los Amerindios. Por otro lado haplotipos que tengan la combinación alélica YAP+/ DYS271G/ α h IX son muy comunes y exclusivos en etnias negras africanas.

Esta tesis se centró en la caracterización de una población mixta de Santiago y de 4 poblaciones aborígenes Chilenas, (Yamanas de Puerto Williams, Pehuenches del alto Bío-Bío, Mapuches de la Isla Huapi y Pascuenses), basándose en el análisis del cromosoma Y.

Se analizaron cinco loci polimórficos en todas las poblaciones. Estos son: YAP, caracterizado por una inserción de una secuencia Alu; DYS199, que comprende un cambio

nucleotídico C→T; DYS271, que incluye un cambio nucleotídico A→G; DYS19, que es un locus STR y α h, que es un locus ubicado en el centrómero del cromosoma Y. Además, en la población de la Isla de Pascua, se analizó el locus RPS4Y, que involucra una transición C→T y el locus 92R7, que incluye el mismo tipo de transición. La mayoría de estos loci fue analizada por PCR y en algunos casos por digestión con enzimas de restricción (RFLP).

Los resultados muestran que la población Pehuenche tiene el mayor porcentaje (82%) de cromosomas Y de origen Amerindio, mientras que la población Yamana presenta el menor (16,7%). La población Mapuche de la Isla Huapi mostró un 64,3% de origen paterno Amerindio, además de dos individuos que presentaron cromosomas Y de origen Africano. Por otro lado la población de Santiago presentó un alto porcentaje de haplotipos caucásicos (66,6%). Por último la población de la Isla de Pascua presentó un haplotipo mayoritario de origen Asiático- Melanésico (85%).

A partir de estos resultados se puede concluir que la población Pehuenche al igual que la Mapuche han permanecido relativamente aisladas, por lo que han conservado los haplotipos Amerindios de origen paterno y no así la población Yamana. Finalmente los resultados encontrados en la Isla de Pascua concuerdan perfectamente con las teorías del poblamiento de la Polinesia vía, Este de Asia- Melanesia- Polinesia y también concuerdan con la historia reciente de la Isla.

El trabajo de esta tesis es complementario a un estudio previo realizado en nuestro laboratorio en relación con marcadores genéticos del DNA mitocondrial. En conjunto estos dos estudios muestran que existe un 60% de conservación de linajes paternos y un 100% de linajes maternos tanto en Pehuenches como en Mapuches. En la población de Santiago se demostró un 82% de linajes maternos de origen Amerindio. Este resultado previo, junto con

los resultados encontrados en relación con el cromosoma Y serían un reflejo de la historia de la colonización española en Chile, en la cual participaron preferentemente hombres españoles. De esta forma tenemos hoy una buena conservación de linajes maternos Amerindios y por el lado paterno una mayor proporción de linajes Europeos.

**ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF Y CHROMOSOME HAPLOTYPES
IN CHILEAN ABORIGINAL POPULATION AND IN
SANTIAGO POPULATION**

SUMMARY

The utilization of molecular genetic tools in population genetics studies have been very useful in order to better understanding the origins and migrations of modern humans. The analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) and Y chromosome polymorphic loci, has been extensively used in the molecular genetic characterization of the alive aboriginal populations, through paternal and maternal lineages respectively.

The Y chromosome presents two characteristics that turn it into a valuable tool for population studies. The first one is that it has an exclusively paternal inheritance, and the second, is that it owns unique sequences in more than 90% of the chromosome, which do not suffer recombination with any other chromosome. From this region different polymorphic loci were chosen to be utilized in this study. The allelic combination of the different polymorphic markers within the Y chromosome, determines an haplotype, which can be characteristic of a determined ethnia or of a geographic region that may include more than one ethnia. Thus the haplotype YAP-/DYS199T/DYS271A/DYS19A,B/ α hII, is recognized as the major Amerindian haplotype, and the haplotype YAP+/DYS271G/ α hIX is very common and exclusive for black Africans ethnia.

This study was based in the analysis of five polymorphic Y chromosome loci, on a mixed population from Santiago and four Chilean aboriginal populations: Yamanas from Puerto Williams, Pehuenches from alto Bio-Bio, Mapuches from the Huapi Island and Pascuences from the Easter Island. The five polymorphic analyzed, are the following: YAP,

characterized by an ALU sequence insertion; DYS199, that includes a C→T nucleotide change; DYS271, including an A→G nucleotide change; DYS19, a STR locus and α , a locus localized in the centromere of the Y chromosome. Also, in the Easter Island group other loci were added in the study. These are the RPS4Y locus, involving a C→T transition, and the 92R7 locus, which includes the same type of transition. The majority of these loci were analyzed by PCR and in some cases by digestion with restriction enzymes (RFLP).

The results show that the Pehuenche population has the highest percentage (82%) of Amerindian Y chromosome origin, while the Yamana population present the lowest one (16.7%). The Mapuche population from the Huapi island showed a 64.3% of Amerindian paternal origin, besides two individuals showing Y chromosomes from African origin. Regarding the population from Santiago we have found very high percentage of Caucasian haplotypes (66.6%). Finally the majority of the population from Easter Island showed a major haplotype from Asian-Melanesic origin (85%).

From these results we can conclude that the Pehuenche as the Mapuche have stayed relatively isolated, conserving in this way a relatively high proportion of the Amerindian paternal lineages in their populations. However this is not the case of the Yamana that seem to be very mixed with European Y chromosome lineages. Finally the results found in the Easter Island perfectly coincide with the theories of the settlement of Polinesia via, East of Asia – Melanesia – Polinesia, and are in agreement with the recent history of the island.

The work of this thesis is complementary to a previous study made in our laboratory in relation to genetic markers from mitochondrial DNA. Together these two studies show that there is a conservation of more than a 60% in paternal lineages and of a 100% in maternal lineages, in Pehuenches as in Mapuches. Regarding the population from Santiago an 82% of

maternal lineages were demonstrated to be from Amerindian origin. The results found in relation to the Y chromosome are a reflex of the history of the Spanish colonization in Chile, in which men preferentially participated.

INTRODUCCION

Desde hace varios siglos el hombre se ha cuestionado acerca del origen y procedencia de la vida. Algunas de estas inquietudes tienen relación con el origen del hombre y su forma de desarrollarse y poblar la Tierra; es aquí donde se plantean las diversas hipótesis acerca del poblamiento de los continentes. Para poder responder a estas interrogantes, en particular, se han utilizado diversos métodos de estudio que abarcan desde la filosofía hasta las ciencias exactas.

La genética poblacional es una ciencia relativamente nueva, que ha sido de gran utilidad en los estudios antropológicos y que ahora, gracias a los avances en genética molecular, se ha convertido en una herramienta que aporta mucho más para este tipo de estudio. Con la finalidad de obtener respuestas a las interrogantes expuestas en el párrafo anterior, la genética molecular de poblaciones se ha planteado diversas formas de estudio. Estas se concentran en la utilización de distintos marcadores genéticos los que dan cuenta de una historia que se remonta en generaciones atrás y que por ende permiten dar una aproximación hacia la comprensión del poblamiento de los continentes. Para este motivo se ha utilizado el DNA mitocondrial (mtDNA) como fuente de información del origen de los linajes maternos ya que el tipo de herencia de este DNA es matrilineal y además se ha utilizado el cromosoma Y como fuente de información del origen de los linajes paternos ya que su tipo de herencia es absolutamente patrilineal. En la presente tesis sólo se desarrollara el estudio de los linajes paternos en poblaciones aborígenes chilenas.

I. POBLAMIENTO AMERICANO

Se ha acumulado una gran cantidad de información arqueológica, lingüística, antropológica y genética que ha permitido plantear varias hipótesis relacionadas con el poblamiento Americano.

Según los datos recolectados se plantea que luego de una evolución inicial en Africa, el hombre se expandió rápidamente dentro de Euro Asia y luego desde Asia habría migrado hacia América y Oceanía.

La mayoría de los autores coinciden en que el poblamiento de América ocurrió desde Asia a través de la región de Bering durante las glaciaciones (Baillet y col., 1994; Schurr y col., 1990; Starikovskaya y col., 1998; Torroni y col., 1992; Ward y col., 1991), sin embargo, aún se mantiene en controversia la manera en que el hombre ingresó a América. Debido a esto se han planteado tres hipótesis que buscan explicar la forma en que el hombre ingresó hacia el nuevo continente.

Según los antecedentes lingüísticos, arqueológicos, antropológicos, dentales y genéticos en 1986 Geenberg y col, plantearon la hipótesis de tres migraciones sucesivas originadas en el noreste de Asia y que habrían ingresado a América a través del estrecho de Bering. La primera de las migraciones correspondería a los Amerindios (Paleoindios) que habrían colonizado el norte, centro y el sur del nuevo continente. La segunda habría correspondido a la población Na- Dené, mientras que la tercera habría estado formada por los Esquimo-Aleutianos.

Otra teoría, postula sólo dos migraciones, en que la primera gran oleada estaría compuesta por los Paleoindios y la segunda por el resto de los grupos (Stariskovskaya. y col., 1998; Torroni y col., 1992).

Finalmente, una de las teorías más novedosas postula la alternativa de una sola gran migración temprana. Su expansión dentro del continente se produciría por los deshielos y las mejores posibilidades de encontrar alimento en lugares remotos para ellos (Ward. y col., 1991; Merriwether y col., 1995).

II. POBLAMIENTO E HISTORIA DE LA ISLA DE PASCUA

II. 1 Poblamiento de la Polinesia y de la Isla de Pascua

La Polinesia es un conjunto de islas e islotes ubicados en el océano Pacífico. Básicamente es un triángulo cuyos vértices son: Hawai por el norte, Nueva Zelanda por el oeste y la Isla de Pascua también llamada "Easter Island" por el este (Figura 1).

Evidencias arqueológicas, lingüísticas y antropológicas han sido utilizadas para construir el siguiente episodio prehistórico (Diamond, 1999; Nile y Clerk., 1996). Aproximadamente 40.000 años antes del presente, poblaciones aborígenes cazadoras-recolectoras del Sureste de Asia habrían emigrado hacia una gran masa de tierra denominada Sahul, que debido a un cataclismo posterior se separó en lo que actualmente es Australia y Papua Nueva Guinea. Estos inmigrantes serían, según se piensa, los ancestros de los nativos Australianos y los de tierras altas de Papua Nueva Guinea. La segunda gran oleada migratoria hacia esta región, fue hace 6.000 años aproximadamente, en la cual, poblaciones de Mongolia y del sureste de China habrían emigrado hacia las costas de China y de Taiwán. En muy poco tiempo éstos habrían desarrollado buenas técnicas de navegación y gracias a ellas, migrarían hacia la Melanesia a través de las Islas Salomón. La colonización inicial de la Melanesia

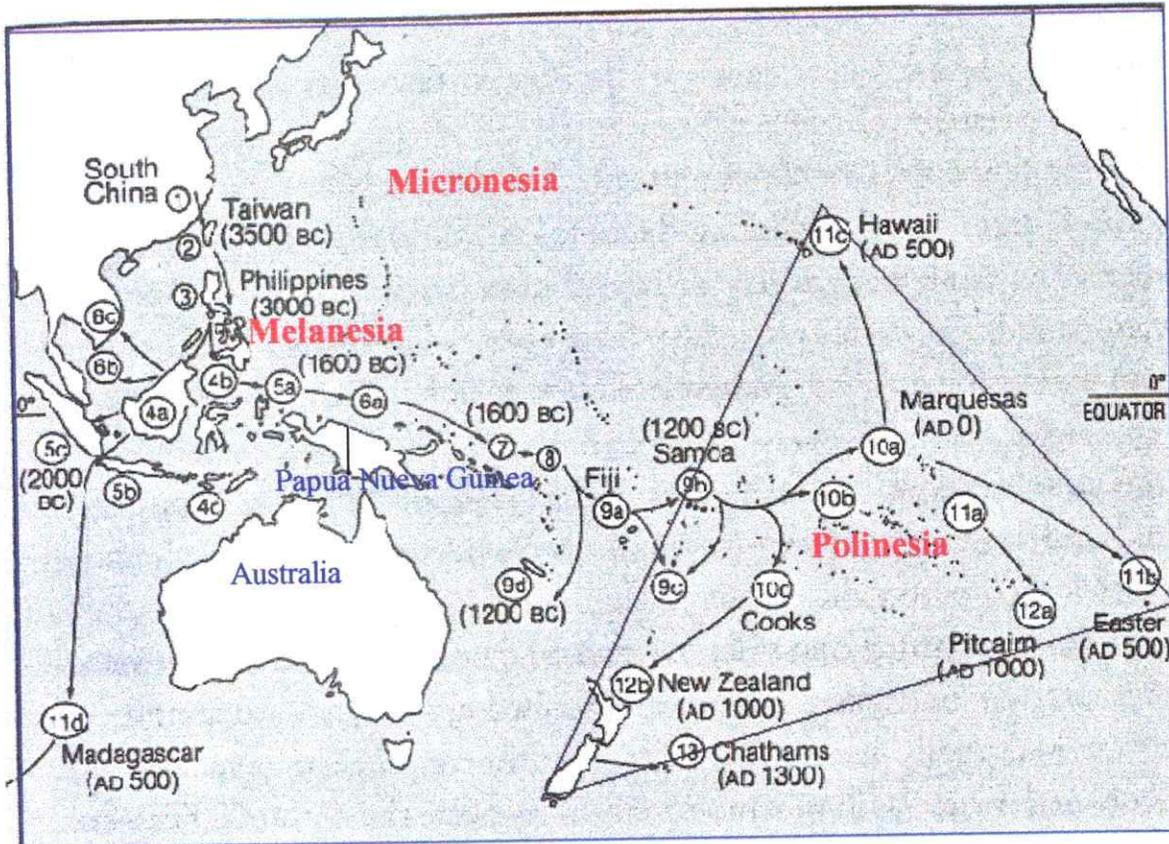


Figura 1. Vía de migraciones propuesta para el poblamiento de la Polinesia. Se muestra, mediante flechas y círculos con números y letras, las etapas espacio-temporales propuestas para el poblamiento de la Polinesia, incluyendo la Isla de Pascua. Se observa las islas que componen la Micronesia, la Melanesia y el triángulo Polinésico. Se puede apreciar que la Melanesia fue poblada desde el Este de Asia y que a partir de la Melanesia se pobló el triángulo Polinésico. En particular, la Isla de Pascua fue poblada, según esto, desde las Islas Marquesas hace 1500 años.

coincide con el desarrollo de la cultura Lapita la que se caracterizó, entre otras cosas, por el gran desarrollo de la navegación, de esta manera con el transcurso del tiempo se fueron poblando el resto de las Islas de la Melanesia y el oeste de la Polinesia como se describe en la figura 1 (Diamond 1999). La colonización de la lejana Oceanía fue seguida por un lento y largo período de adaptación en el oeste de la Polinesia, durante el cual se desarrolló una cultura polinésica distinta. Posteriormente la colonización hacia la lejana Polinesia continúa, y para el año 300 DC las Islas Marquesas ya estaban pobladas. Desde ahí hace 1500 años se habría poblado Hawai y la Isla de Pascua, finalizando en el poblamiento de Aotearoa o Nueva Zelanda que es la cuna de la cultura Maorí (Hurler y col., 1998; Diamond, 1999; Nile y Clerk., 1996).

A pesar de lo descrito en el párrafo anterior los estudiosos aún discrepan en la forma en que fue poblada la Polinesia, aunque la mayoría de ellos coinciden que fue a partir de la Melanesia. Sin embargo hay unos pocos estudiosos que aún afirman que hubo una colonización substancial de la Polinesia desde América (Heyerdahl, 1950).

Cabe destacar que durante los últimos 300 años ha habido un contacto importante entre Polinésicos y Europeos, lo que pudo haber cambiado la composición genética de la población Polinésica (Nile y col., 1996; Hidalgo y col., 1996). En el presente trabajo se analizó una población de la Isla de Pascua con el fin de conocer más acerca de sus orígenes étnicos.

II. 2 Breve reseña histórica de la Isla de Pascua

La Isla de Pascua o Rapanui, como denominan los isleños en su lenguaje a su tierra, está situada, como se dijo en el vértice sureste del triángulo polinésico, a 27° 09' de latitud sur y a 109° 27' de longitud oeste. Rapanui está equidistante entre las costas de Chile y de Papeete, capital de Tahiti, aproximadamente a unos 3.600 km de cada una. La forma de la isla es más

bien triangular, como se muestra en el esquema de la figura 2 que ilustra la forma y los puntos principales de la isla.

La Isla de Pascua fue poblada, como se mencionó anteriormente, aproximadamente en el año 500 DC desde las Islas Marquesas y pasaron 1200 años en que estuvo completamente aislada del resto del mundo.

El Holandés Jacob Roggveen descubrió la Isla en el año 1722 en el día de Pascua de Resurrección a lo cual se le debe su nombre. Desde ese momento una serie de sucesos han afectado la población de la Isla de Pascua. Durante aproximadamente 140 años alrededor de 100 barcos Europeos visitaron la Isla con el único fin de comercializar con los nativos. Durante el siglo XIX lo que más ofrecían los Isleños a los Europeos eran sus mujeres a cambio de ciertos presentes (Hidalgo y col.,1996).

En el año 1862, debido a una escasez en la mano de obra en el Perú, comienza una "Piratería Peruana" en busca de esclavos Pascuenses. Sólo unos pocos Pascuenses sobrevivieron a tan penosa experiencia los cuales regresaron a la Isla introduciendo enfermedades que causaron una fuerte reducción de la población. Alrededor de 10 años después algunos misioneros reclutaron más de 300 nativos para llevarlos a Tahití y Mangareva. De esta manera para 1877 sólo había en la isla 61 hombres y 49 mujeres que sobrevivieron a estos hechos, siendo la mayoría de ellos ancianos sin capacidad de reproducirse.

En el año 1888 la Isla pasa a soberanía Chilena, desde entonces la población isleña se mantuvo bajo una estricta endogamia hasta 1965 cuando se abrió el aeropuerto de Mataveri. En 1992 Rapanui tenía 2764 habitantes de los cuales 700 eran extranjeros (Hidalgo y col.,1996).

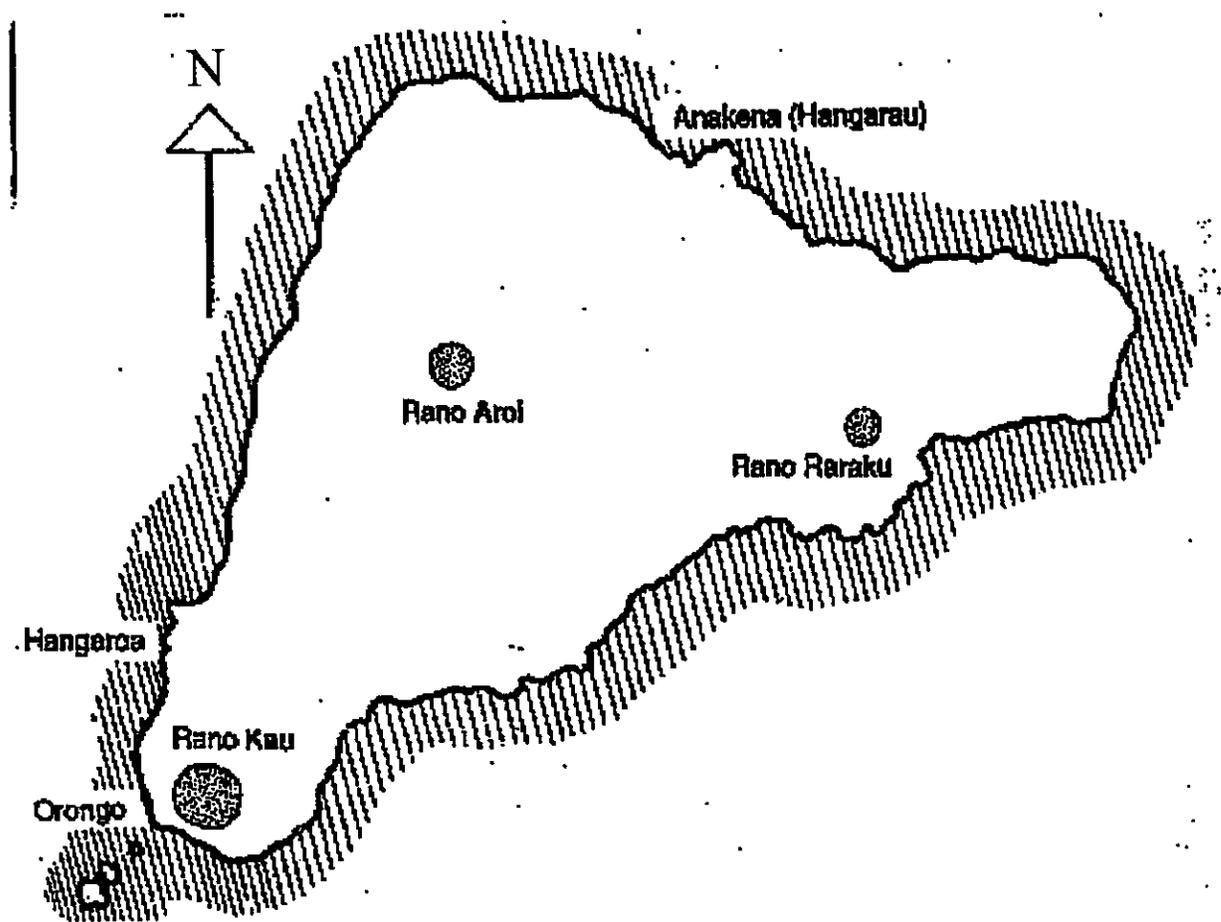


Figura 2. Esquema geográfico de la Isla de Pascua. Se observa la forma geográfica de la Isla de Pascua y los puntos principales de ella. La flecha indica el Norte y el  = Volcanes

III. CROMOSOMA Y

El cromosoma Y es el encargado de determinar el sexo masculino en el hombre. En forma genérica está constituido por tres partes distintas; dos de ellas se encuentran en la región subtelomérica de los brazos largo (Yq) y corto (Yp). Estas regiones poseen homología con el cromosoma X, sufren recombinación y se ha visto que son esenciales para la correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis, por lo que se les llama regiones pseudoautosómicas. Existe una tercera región, ubicada entre las dos mencionadas anteriormente, está constituida por más del 90% del cromosoma, contiene secuencias únicas del cromosoma Y que no presentan homología con ninguna otra región de otro cromosoma y no sufren recombinación. Esta región es la utilizada para estudios evolutivos (Pena y col., 1997; Santos y col., 1999a). La variación en el DNA del cromosoma Y, producida por eventos mutacionales, es acumulada a lo largo de las generaciones sucesivas pasando de padres a hijos, generando linajes paternos factibles de seguir hacia atrás en el tiempo.

El conocimiento de diversos loci polimórficos del cromosoma Y ha permitido datar, en forma aproximada, un ancestro común para el hombre, ubicándolo entre 411.000 a 37.000 años atrás en Africa (Hammer 1995; Pääbo 1995; Whitfield y col., 1995).

En resumen las propiedades fundamentales del cromosoma Y que lo convierten en una buena herramienta para los estudios evolutivos de la antropología molecular son:

- 1.- Su exclusiva herencia paterna
- 2.- El tener una región, que representa casi el 90% del cromosoma, que no exhibe recombinación con ningún otro cromosoma.

III. 1 Variabilidad en la región específica del cromosoma Y

Los estudios realizados en el cromosoma Y han permitido determinar una menor variabilidad en secuencia con relación a los autosomas y al cromosoma X. Esto puede explicarse debido a que el cromosoma Y contiene genes esenciales para la determinación del sexo y la fertilidad de los individuos, por lo cual las mutaciones que ocurran en esta región podrían provocar la ausencia de descendencia. Por otra parte, se ha planteado que en el curso del poblamiento de América ha ocurrido una drástica reducción de la población masculina debido a guerras y a una selección natural, lo que habría reducido el número de cromosomas Y en América (Hammer 1995; Withfield, y col., 1995). Algo muy similar habría ocurrido con la Isla de Pascua debido a la historia, expuesta en el punto anterior.

III.2 Loci polimórficos del cromosoma Y

Los marcadores polimórficos descritos para este cromosoma comprenden elementos de evolución lenta como los polimorfismos de cambios puntuales (SNP) e inserción de secuencias Alu y también los elementos de evolución rápida como los mini y microsátélites, VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) y STR (Short Tandem Repeats) respectivamente.

En la figura 3 se resumen los marcadores utilizados en este estudio y la ubicación de ellos dentro del cromosoma Y.

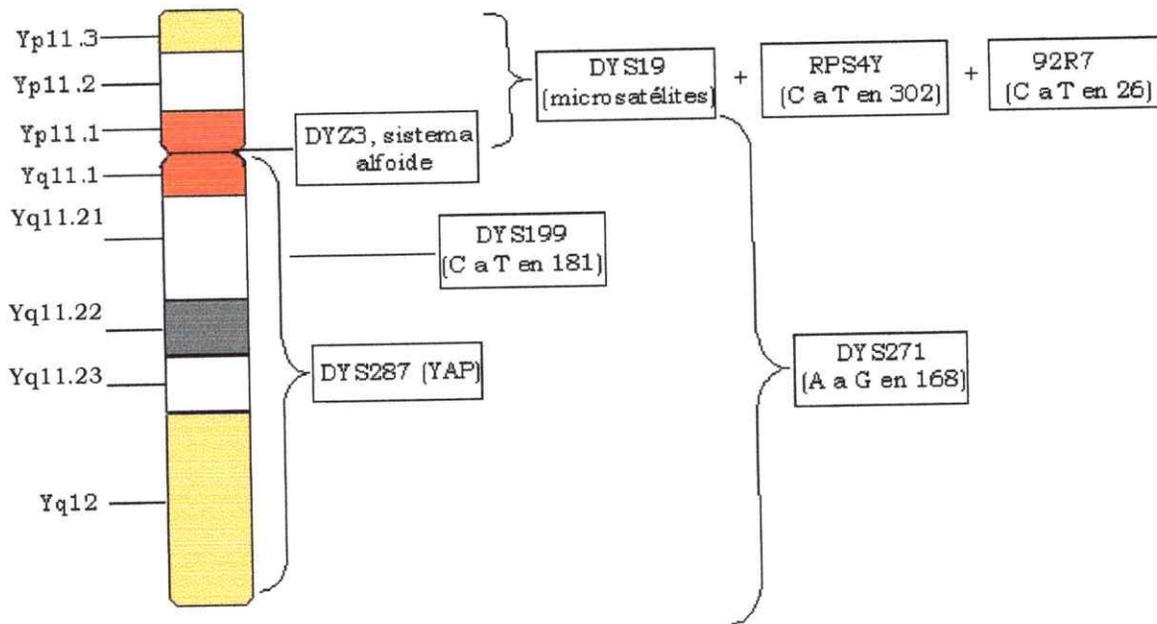


Figura 3: Marcadores polimórficos para cromosoma Y. En la figura se observa la ubicación relativa del marcador genético analizado y el tipo de polimorfismo al cual pertenece cada uno. En algunos casos la ubicación del marcador aún no está definida completamente y por lo tanto su ubicación abarca gran parte del cromosoma. En la figura se observa la división cromosómica correspondiente al cromosoma Y por el método del bandeo G. En rojo se muestra el centrómero, en negro la heterocromatina, en blanco se indica la eucromatina y en amarillo la heterocromatina constitutiva.

A. Marcadores bialélicos

Dentro de esta clasificación tenemos los polimorfismos de nucleótido único o SNP y a los polimorfismos de inserción de retroelementos como las secuencias Alu.

Los SNP representan a dos o más bases que sirven de alternativa en la misma posición dentro del genoma. Este tipo de polimorfismo es originado por pequeñas deleciones/inserciones o sustituciones de una base. Estos eventos tienen una tasa mutacional de alrededor de 10^{-7} por sitio por generación o aún puede ser menor, lo que hace difícil que se produzca una reversión de la mutación y por ende se dice que los SNP son marcadores de evolución lenta. Este tipo de mutaciones se debe básicamente a fallas en los mecanismos de replicación por la DNA polimerasa y reparación del DNA. Cabe señalar que el número de transiciones en el genoma humano es mucho mayor que el número de transversiones y que además son las transiciones C → T las que predominan. Para poder explicar esto último hay que mencionar que las citosinas metiladas pueden sufrir una oxidación del grupo amino convirtiéndose en un grupo ceto y transformándose, de esta manera, en timina, lo que "burla" al sistema de reparación y por lo tanto se fija la transición.

Se dice que los marcadores SNP son binarios ya que se ha observado que generalmente tienen dos estados alélicos, el ancestral (0) y el derivado (1). Para determinar cual de los dos alelos es el ancestral y cual es el derivado se necesita del conocimiento de la genética molecular de especies relacionadas (como otros primates), de esta manera se supone como ancestral (0) al alelo compartido entre el hombre y el resto de los primates, que en muchos casos coincide con el alelo más común en la población mundial (Hammer, 1995; Underhill y col., 1996). El primer SNP descrito en el cromosoma Y fue en la posición 168 del locus DYS271. En este lugar se encuentra una Adenina o una Guanina (A o G). El alelo ancestral se determinó por el análisis del mismo locus en el chimpancé y en el gorila y resultó que ellos

tenían el alelo que tiene el nucleótido A (Adenina) por lo que se supuso a ese como ancestral. Por otro lado se ha descrito que el alelo derivado, que posee el nucleótido G (Guanina), se ha encontrado en poblaciones muy restringidas dentro de Africa y el ancestral A se ha encontrado en el resto del mundo (Seielstad y col., 1994). En general, el espectro geográfico de la distribución del alelo derivado es proporcional al tiempo que ha transcurrido desde que ocurrió la mutación. Es decir mientras más geográficamente localizada sea la presencia del alelo derivado, más recientemente habría ocurrido la mutación y por ende sería muy característica de una determinada población. Por otra parte mientras más difusa sea la distribución geográfica del alelo derivado más antigua es la mutación, lo que es más, algunas de ellas habrían ocurrido antes de la gran migración fuera de Africa hace ya más de 100.000 años atrás (Cavalli-Sforza y col., 1994). Los marcadores SNP son fáciles de analizar ya que muchos de los cambios de bases generan o eliminan sitios de restricción lo que permite su análisis por RFLP.

En la tabla 1 se detallan los marcadores SNP utilizados en el presente estudio.

Marcador	Polimorfismo	Distribución geográfica Del alelo derivado	Referencias
DYS 271	A → G en 168	Sub-Sahara, Africa	Seielstad y col., 1994
DYS 199	C → T en 181	América (Amerindios)	Underhill y col., 1996
92R7	C → T en 26	Europa, Amerindios y parte de Asia	Mitchell y col., 1997 Santos y col., 1999 Mathias y col., 1994
RPS4Y	C → T en 302	Melanesia, Centro-este de Asia y parte del Norte de América	Bergen y col., 1999 Karafet y col., 1999

Tabla 1: Muestra los marcadores SNP utilizados en el presente estudio. Para cada marcador SNP se muestra su polimorfismo característico y la distribución geográfica de su alelo derivado.

El otro tipo de marcador bialélico, lo constituyen, las inserciones o deleciones de retroelementos como las SINEs. Estas secuencias cortas, llamadas también secuencias ALU se encuentran repetidas en diferentes lugares del genoma humano. Las secuencias Alu se encuentran en alrededor de 500.000 copias por genoma haploide. Su tasa de inserción en un lugar específico dentro del genoma humano es mucho menor a la tasa de mutación de los SNP (Hammer y col., 1995), por lo tanto también se dice que son marcadores de evolución lenta. Al igual que los SNP, son marcadores binarios y el estado ancestral queda definido por la ausencia de inserción de la secuencia Alu. Otra característica importante de estas secuencias es que la reversión es virtualmente imposible ya que no existe un mecanismo conocido capaz de escindir en forma precisa el retroelemento después de la inserción.

El único locus de este tipo descrito en el cromosoma Y humano es el YAP, que es un elemento Alu que, según Hammer y col., 1997, tiene su origen de inserción aproximadamente hace 130.000 años en Africa. Sin embargo, estudios recientes sugieren un origen Asiático a los cromosomas YAP+ (con inserción Alu) (Batzer y col., 1996; Altheide y col., 1997; Bravi y col., 2000). Por lo tanto el origen de los cromosomas YAP+ aún no esta bien dilucidado. En general, los cromosomas YAP+ son muy escasos en la población mundial y se ha observado con mayor frecuencia en poblaciones africanas, en individuos japoneses y en tibetanos (Hammer y Horai 1995).

En general los marcadores bialélicos presentan una tasa de mutación lenta, por lo que entregan información de mayor ancestralidad que los marcadores de evolución más rápida (Santos y col., 1999a).

B. Marcadores multialélicos

1. Microsatélites, STR

Los marcadores microsatélites están constituidos por secuencias de di, tri o tetranucleótidos, que se repiten en tandem un número variable de veces. Por esta razón también se conocen como loci STR (Short Tandem Repeats). El origen molecular de estos loci es aún desconocido aunque existen ciertas teorías que intentan explicar este fenómeno. Existen diversos loci STR descritos para el cromosoma Y. Estos marcadores presentan una velocidad de mutación de alrededor de 2×10^{-3} por locus por generación (Santos y col., 1999a), por lo tanto son marcadores de evolución rápida y han sido utilizados tanto en estudios evolutivos como en medicina forense, y determinación de la paternidad (Santos y col., 1999a).

En el presente trabajo se utilizó el marcador microsatelital DYS 19 que contiene motivos $(GATA)_n$ y que ha sido analizado previamente en poblaciones Amerindias. El número de repeticiones y, por lo tanto, el tamaño del amplificado será el que determine el alelo.

Hasta el momento se han identificado alrededor de 9 alelos para este marcador cuyos tamaños varían entre 178 y 206 pb. Los alelos se denominan con letras, siendo Y equivalente a 12 repeticiones (178 pb); Z, 13 repeticiones (182 pb); A, 14 repeticiones (186pb); B, 15 repeticiones (190pb); C, 16 repeticiones (194pb); D, 17 repeticiones (198pb); E, 18 repeticiones (202 pb); F, 19 repeticiones (206pb) y "nulo". Este último alelo se denomina así debido a la ausencia de repeticiones del tetranucleótido (Santos y col., 1993; Bianchi y col., 1998; Pena y col., 1997; Santos y col., 1996a).

La distribución de estos alelos en poblaciones Amerindias ha sido investigada por varios autores y todos coinciden en que el alelo A se encuentra mayoritariamente en América (Bianchi y col., 1998; Santos y col., 1996a).

En la Figura 4 se muestra la distribución de los distintos alelos del marcador microsatelital DYS 19, en diferentes regiones del mundo.

2. DNA satélite (αh)

El DNA satélite alfoide se encuentra en la región pericentromérica, y está compuesto de secuencias repetidas que no se encuentran en tandem. En el cromosoma Y se ha descrito una región, llamada sistema alfoide, que consiste en una o más secuencias que varían en muy pocos nucleótidos. Para este sistema se ha descrito un método de análisis basado en la amplificación por PCR de estas secuencias, seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalantes.

Para esto se utiliza un par de partidores con el fin de amplificar las secuencias repetidas, que se encuentran en dos regiones llamadas: locus del lado izquierdo (locus αhL) y una región que comprende varios loci del lado derecho (loci $\alpha h\#$), tal como se muestra en la figura 5. Esta amplificación es factible debido a que cada segmento alfoide tiene la misma secuencia que lo flanquea, o sea los extremos son invariables para cada uno de ellos.

El locus del lado izquierdo del bloque alfoide usualmente es invariable entre los individuos (Santos y col., 1995; Santos 1997) y presenta una delección de 4 pb con respecto a los loci del lado derecho (285 pb). Estas dos regiones son coamplificadas durante la reacción de PCR. Luego los productos son sometidos a desnaturalación y renaturación lenta, con lo cual las hebras simples de DNA de los loci derecho e izquierdo formarán hetero-dobletes (dobletes heterólogos) u homo-dobletes (dobletes homólogos).

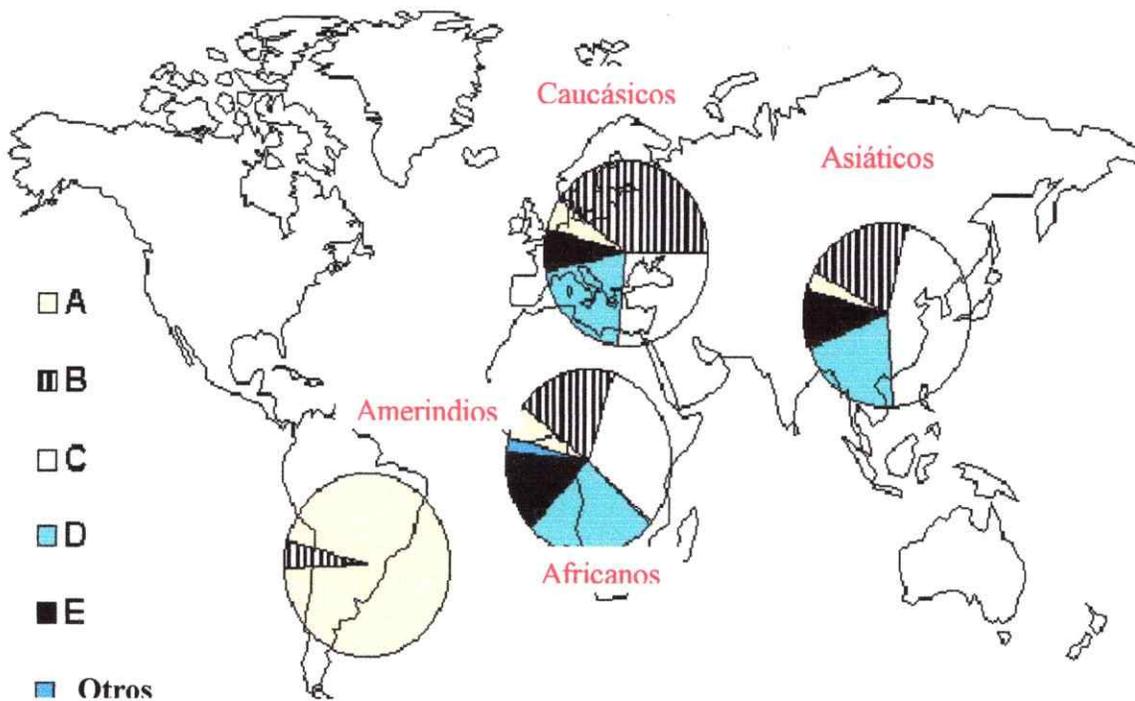


Figura 4. Distribución de los diferentes alelos del marcador microsatélite DYS19 en distintas regiones del mundo. En la figura se observa la distribución porcentual de los distintos alelos en los diferentes continentes y etnias. Se evidencia la alta frecuencia del alelo A en los Amerindios, lo que no sucede con el resto de las etnias presentadas en el diagrama (Santos y col., 1996a).

Esquema representativo de un haplotipo α hX

Bloque alfoide en centrómero Y

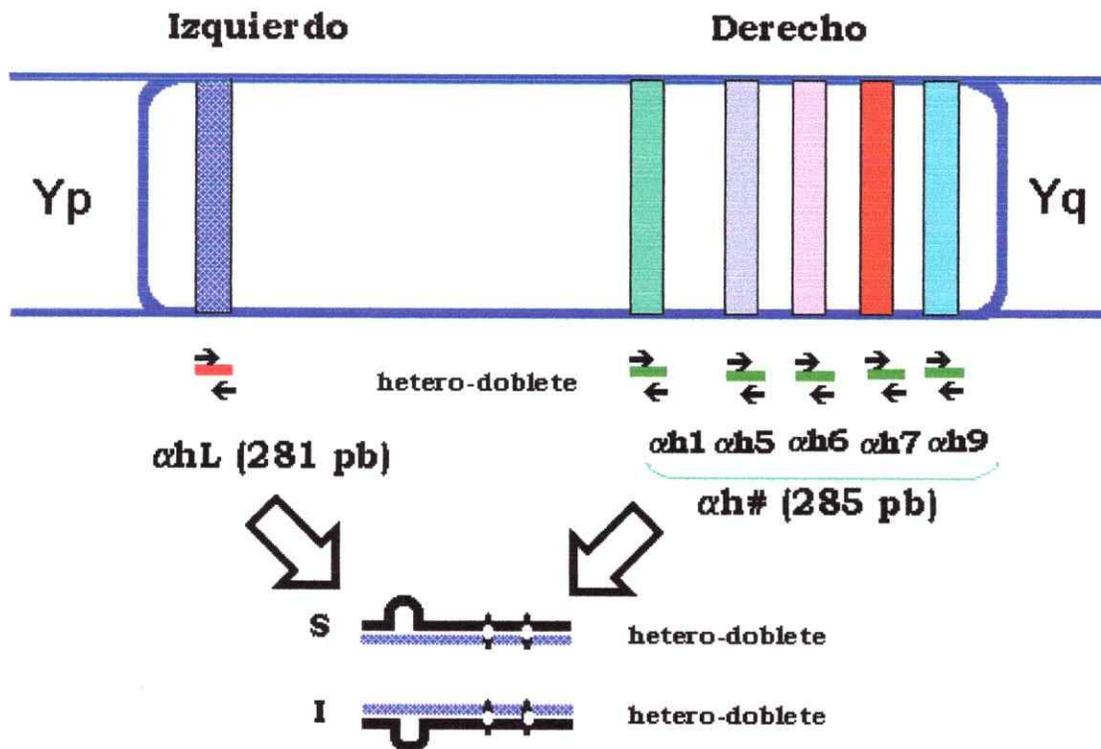


Figura 5: Sistema alfoide y formación de hetero-dobletes. En la figura se muestra un esquema que representa un haplotipo α h X perteneciente a un hombre africano compuesto por cinco distintos pares de hetero-dobletes. Cada par está formado por la combinación de α hL con α h# generando un hetero-doblete superior (S) y uno inferior (I). Los bloques de distintos colores a la derecha del esquema indican la diferencia en secuencia entre ellos y el bloque izquierdo corresponde a una diferencia tanto en secuencia como en tamaño (Santos y col., 1997).

En los hetero-dobletes se forma una horquilla (loop) en la hebra simple que tiene 4 nucleótidos extra, lo cual retarda su migración en el campo electroforético con respecto a los homo-dobletes. Adicionalmente a la deleción de 4 pb también se encuentran distintos puntos de mutación presentes en cada locus de $\alpha h\#$ causando un desapareamiento en los hetero-dobletes, y retardando aún más la migración de éstos, como se muestra en las figuras 5 y 6. Como consecuencia, la combinación de αhL con cada uno de los $\alpha h\#$ ($\# = 1$ a 39) genera un par de hetero-dobletes superior e inferior (figura 6). Un individuo puede tener uno o más loci $\alpha h\#$, de esta manera el número de hetero-dobletes que se visualizan en una electroforesis varía entre los individuos. La combinación de los diferentes hetero-dobletes genera un haplotipo característico. De esta forma se han identificado alrededor de 53 haplotipos (Santos y col., 1995; Santos 1997), los cuales son el resultado de la combinatoria de algunos de los 39 hetero-dobletes identificados.

Se ha propuesto que los haplotipos que presentan un menor número de hetero-dobletes revelan una deleción de alguno de los $\alpha h\#$.

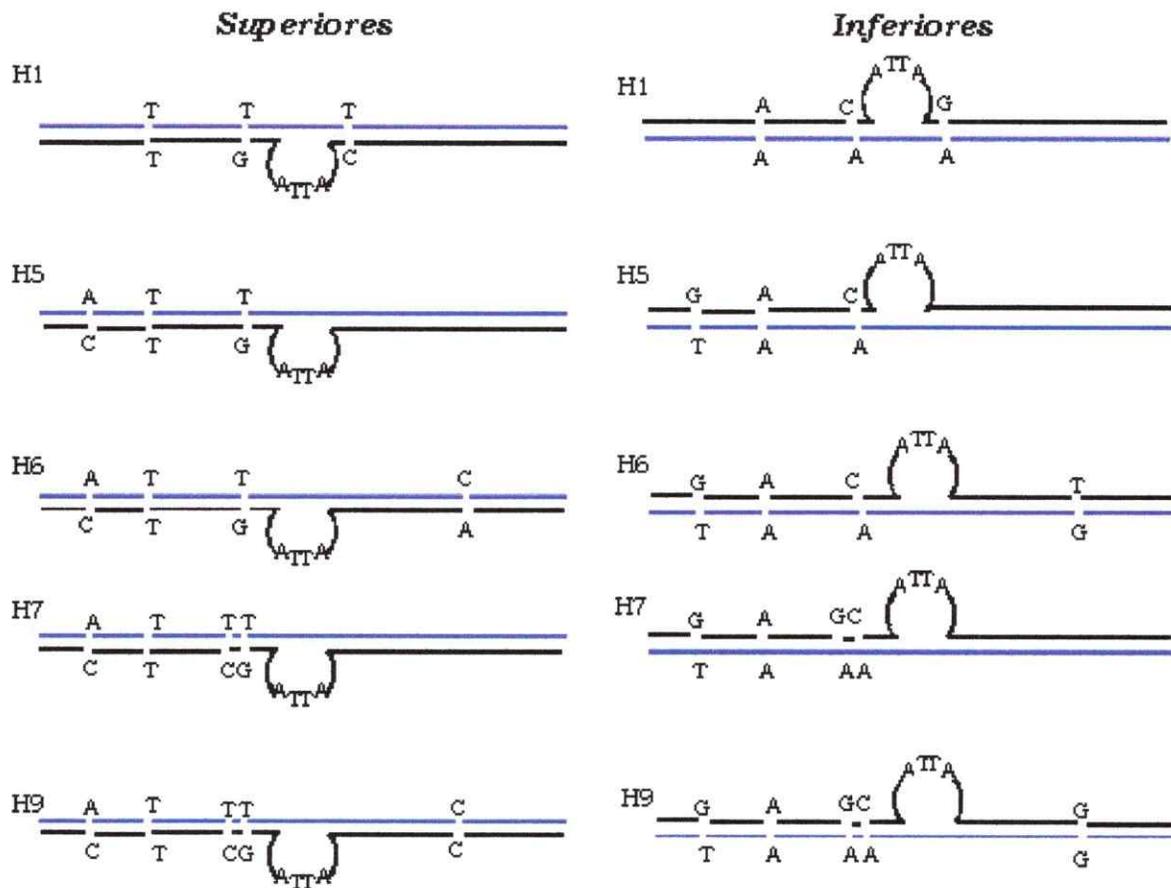


Figura 6: Esquema de pares de hetero-doblete (h1, h5, h6, h7, h9). En la figura se muestra la formación de distintos pares de hetero-doblete formados por ah# (negro) y ahL (azul) que presenta la delección de 4 pb, representada por el loop generado en ah#. Se muestran algunos cambios puntuales que se identifican por los nucleótidos anotados y que generan desapareamiento puntual. Estos difieren entre cada par de hetero-doblete lo que provoca una migración diferente entre cada uno.

III.3 Haplotipos del cromosoma Y, característicos para diversas poblaciones

La combinación de los diferentes alelos y haplotipos de cada uno de los marcadores polimórficos descritos constituye un haplotipo mayor. Muchos haplotipos son característicos de alguna etnia o de algún lugar geográfico por encontrarse en una alta proporción con respecto a otras poblaciones.

Los haplotipos representativos de determinadas poblaciones pueden definirse por uno, dos o varios loci diferentes. Por ejemplo, haplotipos que contengan la inserción Alu, o sea, que sean YAP+, pueden tener un origen diverso ya sea en Africa, Asia o Europa (Bravi y col., 2000). Si además de tener la inserción ALU (YAP+) presentan por ejemplo el alelo I para el marcador DYS271 y presentan un haplotipo alfoide V ó IX asociado, podemos decir que es un haplotipo característico de poblaciones africanas y específicamente de la región del sur del Sahara (Seielstad y col., 1994; Bravi y col., 2000). Por otro lado, haplotipos que presenten el alelo derivado en el marcador RPS4Y son característicos en algunas poblaciones melanésicas y asiáticas (Bergen y col., 1999; Karafet y col., 1999). En cuanto a poblaciones europeas o caucásicas no se ha encontrado ningún marcador bialélico exclusivo que los caracterice, sin embargo se sabe que la combinación DYS19B/ α h II es muy frecuente en esas poblaciones (Santos y col., 1996b; Bianchi y col., 1997) y además las combinaciones DYS19B/ α hIII y DYS19C/ α hIII son bastante frecuentes en poblaciones europeas aunque también en las asiáticas (Dr. Fabricio Santos, comunicación personal).

Para el caso de los Amerindios hay que destacar que éstos constituyen uno de los grupos étnicos más caracterizados para el cromosoma Y. Es así como en un principio se aceptaba la combinación DYS19A/ α h II como altamente frecuente y altamente exclusiva para Amerindios, ya que no ha sido observada en Asiáticos ni en Africanos y sólo en un 10% de

los Caucásicos (Bianchi y col., 1997; Pena y col., 1995). Posteriormente, el descubrimiento del marcador DYS199 acotó todavía más al haplotipo Amerindio, ya que su alelo derivado es característico para estas poblaciones. Por último los análisis de los marcadores DYS271 y DYS287 (YAP) en las poblaciones Amerindias han permitido descartar mezcla con Africanos, Asiáticos y Europeos (Bianchi y col., 1997; Bianchi y col., 1998; Bravi y col., 1997). Lo que se postula en resumen es la presencia de al menos cinco haplotipos fundadores en América, que serían: YAP-/ DYS199T/ DYS271A/ DYS19A o B/ α h I, y los haplotipos YAP-/ DYS199T/ DYS271A/ DYS19A, B o Z/ α II, siendo el haplotipo YAP-/ DYS199T/ DYS271A/ DYS19A/ α h II el que se ha encontrado con mayor frecuencia en las distintas poblaciones Amerindias estudiadas. Por lo tanto a éste se le reconoce como el haplotipo Amerindio mayoritario o el haplotipo del "Adán" Amerindio (Bianchi y col., 1997; Bianchi y col., 1998; Pena y col., 1995). Recientemente se ha encontrado la presencia del alelo C para el marcador DYS199 (alelo ancestral) en poblaciones indígenas de América del Norte y de Colombia (Santos y col., 1999b; Ruiz-Linares y col., 1999). Esto ha llevado a postular que la mutación DYS199T habría ocurrido durante el poblamiento de América, y entonces sería posible encontrar individuos con el alelo DYS199C que tuvieran origen Amerindio, y no atribuir la presencia de éste a un origen exclusivamente europeo, como ha ocurrido hasta ahora (Ruiz-Linares y col., 1999).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Estudiar 7 loci polimórficos del cromosoma Y en 4 poblaciones aborígenes Chilenas (Mapuches, Pehuenches, Yamanas y Pascuenses) y en la población de Santiago con el fin determinar los haplotipos frecuentes presentes y su probable origen ancestral.

Objetivos Específicos

- Analizar los siguientes loci polimórficos para cada una de las poblaciones: DYS287 (YAP), DYS199, DYS271, DYS19 y Sistema Alfoide.
- Analizar los siguientes loci polimórficos en la población de la Isla de Pascua: 92R7 y RPS4Y, además de los anteriores.
- Determinar los haplotipos más comunes y sus frecuencias para cada una de las poblaciones analizadas.
- Analizar el origen más probable de cada uno de los haplotipos encontrados en cada población.
- Determinar la composición genética y el origen étnico de cada grupo estudiado comparando los resultados obtenidos previamente en DNA mitocondrial con los encontrados en cromosoma Y, para estas mismas poblaciones.

MATERIALES

A) MUESTRAS

Las 107 muestras analizadas incluyen a 5 poblaciones diferentes, de las cuales 4 de ellas corresponden a poblaciones aborígenes Chilenas y una población mixta de Santiago.

Las poblaciones aborígenes Chilenas son las siguientes:

1) *Población Yamana*: En total son 6 muestras de individuos hombres, paternamente no relacionados, que pertenecen a los últimos sobrevivientes de una comunidad Yamana que habita en Puerto Williams, Isla Navarino, Provincia de la Antártica Chilena, en la duodécima región (55° S; 67° 40' W).

2) *Población Pehuenche*: En total son 22 muestras de individuos hombres, no directamente emparentados, de la localidad de Trapa-Trapa en la Provincia del Bio-Bio, octava región (37° 43' S; 71° 16' W).

3) *Población Mapuche*: En total son 14 muestras de individuos hombres, no directamente emparentados, de la Isla Huapi, Provincia de Valdivia, Décima región (40° 15' S; 72° 25' W).

4) *Población de Isla de Pascua*: Se escogieron 20 individuos de sexo masculino de la Isla de Pascua. Los escogidos poseen los 4 primeros apellidos de origen Maori, y no comparten el apellido paterno.

En total tenemos 62 muestras de aborígenes Chilenos, que serán analizadas.

Por último la población de Santiago corresponde a 45 muestras de individuos hombres, no emparentados, escogidos al azar, la mayoría perteneciente a la comuna de La Florida, y unos pocos pertenecientes a otras comunas (Las Condes, Santiago Centro, San Bernardo).

B) REACTIVOS Y ENZIMAS

Los reactivos y enzimas utilizadas en este trabajo se obtuvieron de los siguientes distribuidores:

***New England Biolabs:** Las enzimas de restricción *Mfe* I, *Nla* III, *Bsl* I, con sus respectivos tampones y el plasmido pBR322.

***Promega Inc.:** La enzima de restricción *Hind* III y su respectivo tampón. La enzima *Taq* DNA polimerasa y su tampón, los desoxinucleótidos dATP, dTTP, dCTP, dGTP y el kit de tinción con plata (nitrato de plata y carbonato de sodio).

***Böeringher Mannheim:** *Taq* DNA polimerasa y su tampón.

***Gibco BRL:** Los oligonucleótidos utilizados como partidores para la amplificación por PCR.

***Life Technologies:** Acrilamida, TEMED, EDTA, la urea y el Tris-HCl.

***Merck:** Cloruro de Magnesio, Cloruro de Sodio y Cloruro Potasio. Hidróxido de Sodio, Acido Acético, Acido Bórico, Etanol, Metanol y formaldehído.

***Sigma Chemical Company:** Acetato de Sodio, bin-xilano y silicona.

***FMC Bio Products:** MDETM gel solution, Agarosa y NuSieve Agarosa y GelStar.

***Equilab:** Acido Nítrico.

***Bio Rad:** Bisacrilamida y persulfato de Amonio.

***Stratagene:** Bromuro de Etidio

***J.T. Baker:** Tritón X-100

***Polaroid:** Película Instantánea en blanco y negro tipo 667.

METODOS

I. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO

El DNA genómico de las 107 muestras fue obtenido a partir de sangre. Este DNA había sido extraído previamente en otros trabajos experimentales desarrollados por el laboratorio y se mantenía suspendido en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) a 4°C.

II. AMPLIFICACION DE DNA POR LA TECNICA DE PCR

II. 1 Oligonucleótidos

Se utilizan 14 oligonucleótidos descritos en la literatura para amplificar 7 loci polimórficos del cromosoma Y escogidos para el presente estudio. Los oligonucleótidos utilizados para cada uno de los marcadores polimórficos se detallan en la tabla 2.

II. 2 Reacción de amplificación

Para amplificar las distintas regiones polimórficas del cromosoma Y se utilizan 100 a 300 ng de DNA total, 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa con su tampón específico, en un volumen final de 50µl para todas las reacciones. Las condiciones específicas de amplificación como también los tamaños de los amplificados para cada marcador se detallan en las tablas 3 y 4 respectivamente. Luego para confirmar los productos de la reacción de amplificación se toman 10 µl de la mezcla de PCR y se realiza una electrofóresis en gel de agarosa al 2%, y se tiñe el gel con bromuro de etidio (0,5 mg/ml). Se observa posteriormente la emisión de fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta. El estándar utilizado es el plásmido pBR322 digerido con la enzima *Hinf III*.

NOMBRE	SECUENCIA	LOCUS
YAP.1	ACTGCTAAAAGGGGATGGAT	DYS287
YAP.2	CAGGGGAAGATAAAGAAATA	DYS287
DYS199F	TAATCAGTCTCCTCCCAGCA	DYS199
DYS199R	TTTCATTTTtaggtaccagctcttcccaatt	DYS199
DYS271F	AGGCACTGGTCAGAATGAAG	DYS271
DYS271R	AATGGAAAATACAGCTCCCC	DYS271
DYS19F	CTACTGAGTTTCTGTTATAGT	DYS19
DYS19R	ATGGCATGTAGTGAGGACA	DYS19
ALFAF	TCTGAGACACTTCTTTGTGGTA	DYZ3
ALFAR	CGCTCAAATATCCACTTTCAC	DYZ3
92R7a	TGCATGAACACAAAAGACGTA	92R7
92R7b	GCATTGTTAAATATGACCAGC	92R7
RPS4YF	CCACAGAGATGGTGTGGGTA	RPS4Y
RPS4YR	GAGTGGGAGGGACTGTGAGA	RPS4Y

Tabla 2: Partidores utilizados para la amplificación de los distintos marcadores polimórficos del cromosoma Y. Se muestra el nombre del partidor, la secuencia y el locus en que se encuentra.

MARCADOR	CONDICIONES DEL PCR	PROGRAMA DE PCR
DYS287	200 μM de cada desoxinucleótido, 25 pmoles de cada partidor	1) 2 min a 94°C 2) 30 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 51°C y 1 min a 72°C 3) 2 min a 72°C
DYS199	200 μM de cada desoxinucleótido, 25 pmoles de cada partidor	1) 2 min a 94°C 2) 31 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 53°C y 1 min a 72°C 3) 5 min a 72°C
DYS271	200 μM de cada desoxinucleótido, 25 pmoles de cada partidor	1) 2 min a 94°C 2) 35 ciclos de: 40 s a 94°C, 50 s a 60°C y 50 s a 72°C 3) 5 min a 72°C
DYS19	63 μM de cada desoxinucleótido, 25 pmoles de cada partidor	1) 2 min a 94°C 2) 30 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 51°C y 90 s a 72°C 3) 5 min a 72 °C
ALFOIDE (DYZ3)	63 μM de cada desoxinucleótido, 50 pmoles de cada partidor	1) 3 min a 94°C 2) 40 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 65°C y 60 s a 72°C 3) 10 min a 72°C
92R7	200 μM de cada desoxinucleótido, 50 pmoles de cada partidor	1) 2 min a 94°C 2) 30 ciclos de: 1min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C 3) 5 min a 72°C
RPS4Y	100 μM de cada desoxinucleótido, 50 pmoles de cada partidor	1) 5 min a 94°C 2) 35 ciclos de: 45 s a 94°C, 45 s a 61°C y 45 s a 72°C 3) 5 min a 72°C

Tabla 3: Condiciones y programas para PCR de los distintos loci utilizados como marcadores polimórficos en este estudio.

LOCUS	PARTIDORES	TAMAÑO AMPLIFICADO
DYS287	YAP.1 y YAP.2	155 ó 455 pb
DYS199	DYS199F y DYS199R	211 pb
DYS271	DYS271F y DYS271R	209 pb
DYS19	DYS19F y DYS19R	178-206 pb
Sist.Alf. (DYZ3)	ALFAF y ALFAR	281 y 285 pb
92R7	92R7a y 92R7b	55 pb
RPS4Y	RPS4YF y RPS4YR	528 pb

Tabla 4: Parejas de partidores y tamaños de los amplificadores para cada locus polimórfico del cromosoma Y. En la tabla se muestra los partidores utilizados, el tamaño de los amplificadores para cada uno de los marcadores estudiados.

III. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los marcadores del cromosoma Y del tipo SNP, son generalmente analizados por una amplificación por PCR y posteriormente el producto resultante es digerido con alguna enzima de restricción. Para realizar la digestión, se colocan en un tubo de 0,5 ml, 15 μ l del producto de la reacción de PCR, el tampón recomendado por el proveedor según la enzima de restricción a utilizar y 1 unidad de la enzima de restricción, se completa con agua a un volumen final de 25 μ l. El tubo se incuba a 37°C ó 55°C, según la enzima que se use, por 3 horas. Los fragmentos obtenidos se visualizan por electroforesis en gel de Nusiev-agarosa al 3% (3:1). La electroforesis se realiza en tampón TBE (Tris-borato 9 mM y EDTA 2 mM pH 8) ó TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), según sea el marcador analizado, y se mantiene el voltaje constante a 80 volts por 2 horas. Luego se tiñe el gel con una solución de bromuro de etidio (0,5 mg/ml) ó de GelStar (a la misma concentración) según sea el marcador analizado y se observa la fluorescencia emitida en un transiluminador de luz ultravioleta.

Con este análisis se determina la presencia o ausencia de los sitios de restricción que definen los alelos ancestrales y derivados de los distintos marcadores polimórficos analizados en el presente estudio.

IV. ANÁLISIS DE LOS DISTINTOS MARCADORES POLIMÓRFICOS DEL CROMOSOMA Y

IV. 1. DYS287: El análisis de este marcador se realiza después de la reacción de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 2%. La electroforesis se lleva a cabo en tampón TBE a voltaje constante de 80 volts por 2 horas, luego de este período el gel se tiñe con una solución de bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y se observa la emisión de fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta.

En el gel se observa la presencia (alelo 1=455 pb) o ausencia (alelo 0=155 pb) de la inserción de una secuencia Alu como se aprecia en la figura 7.

IV. 2. DYS199: Luego de amplificar esta región por la técnica de PCR, se digiere el producto amplificado con la enzima *Mfe I*. La digestión se realiza como fue descrita anteriormente en el punto III, a 37°C por 3 horas.. Los productos de la digestión se resuelven por electroforesis en un gel de NuSieve-Agarosa al 3% (3:1) en tampón TBE. El gel se tiñe con una solución de bromuro de etidio y los productos se visualizan en un transiluminador U.V como se muestra en la figura 8. La enzima utilizada en cada caso y los tamaños de los productos obtenidos después de la digestión se resumen en la tabla 5. Cabe destacar que, para poder analizar el polimorfismo por digestión con la enzima *Mfe I*, el partidor más cercano al sitio de corte tiene un cambio nucleotídico que completa la secuencia reconocida por la enzima *Mfe I* (CAATTG), como se muestra en el esquema de la figura 8.

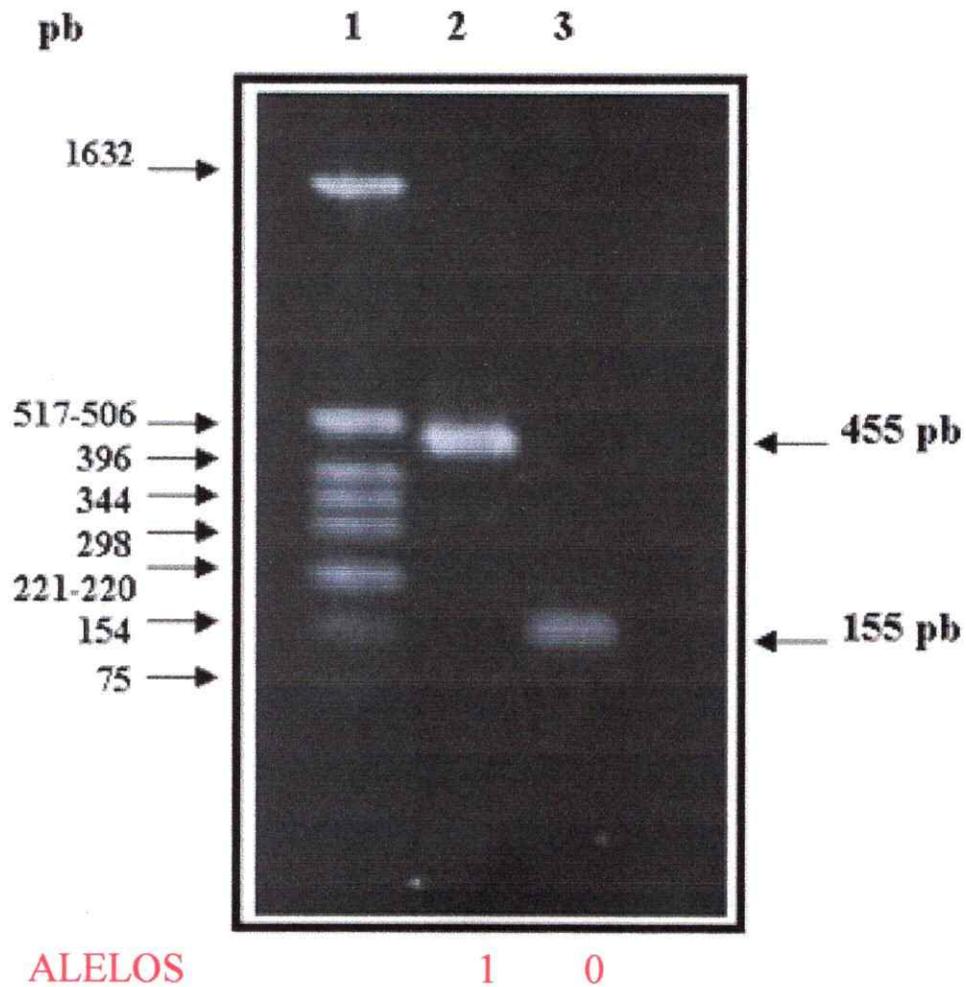
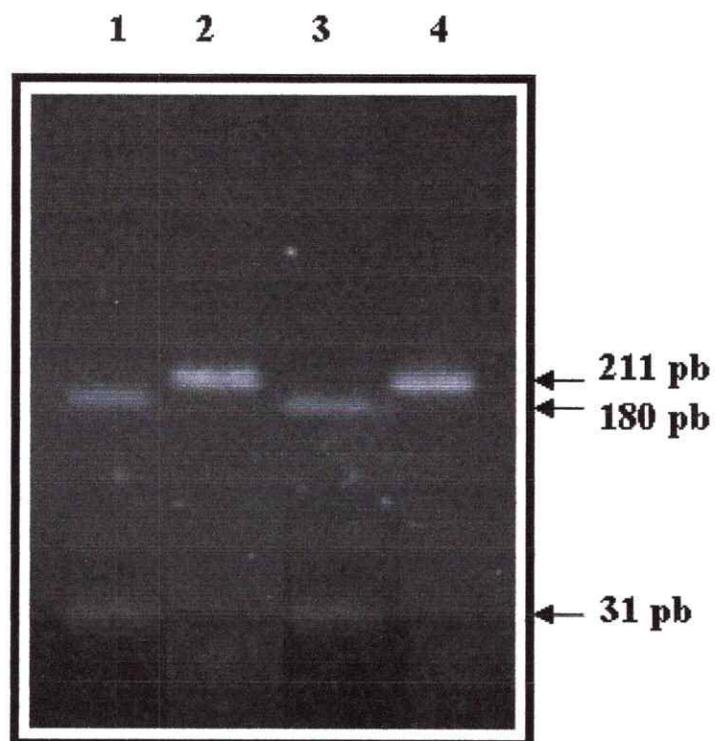


Figura 7: Análisis del marcador DYS287 (YAP) por electroforesis en gel de agarosa. En la figura se observa el resultado de la electroforesis, en el cual se aprecian los dos alelos posibles para el marcador YAP. En el carril 3 se muestra el alelo que no presenta la inserción ALU (155 pb) y en el carril 2 se muestra el alelo 1 que si la tiene (455 pb). Además se presenta en el carril 1 un estándar de peso molecular que corresponde al plásmido pBR322 digerido con *Hinf*I.

B.



A.

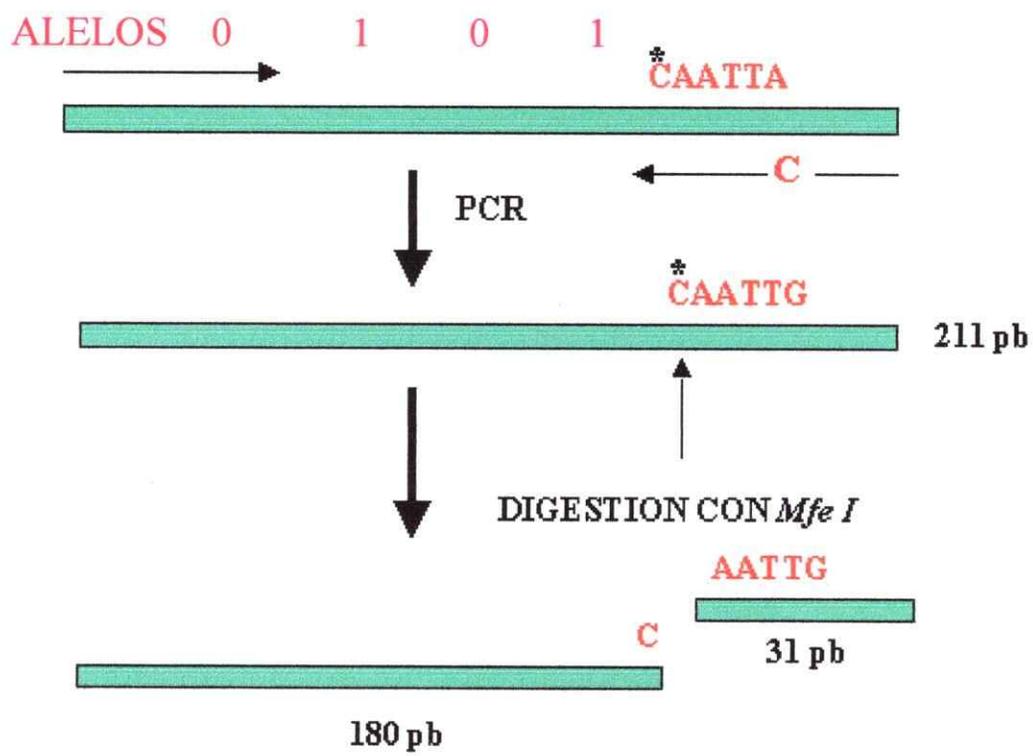


Figura 8: Análisis del locus DYS199 por digestión con *Mfe I*. En **B** se observa el resultado de la electroforesis en gel de agarosa, en el cual se ve la diferencia de migración de los dos alelos luego de la digestión con *Mfe I*. En los carriles 1 y 3 se muestra el alelo que presenta el sitio de restricción (alelo 0) y en los carriles 2 y 4 se muestra el alelo con ausencia del sitio de restricción (alelo 1). En **A** se muestra un esquema de los pasos seguidos para el análisis de este marcador polimórfico. Primero una amplificación por PCR utilizando un partidador que tiene un cambio nucleotídico que completa la secuencia reconocida por la enzima *Mfe I*, luego una digestión con dicha enzima. El asterisco muestra el lugar donde ocurre el polimorfismo y la flecha vertical muestra el sitio de corte de la enzima.

IV. 3. DYS271: Luego de la amplificación por la técnica de PCR, se digiere el amplificado con la enzima *Nla III* siguiendo las instrucciones del proveedor y las señaladas en el punto III. Se incuba con la enzima a 37°C por 3 horas. La resolución de la digestión se realiza por electroforesis en gel de NuSieve-agarosa 3% (3:1) en tampón TBE y luego se tiñe con bromuro de etidio 0,5 mg/ml. Los fragmentos obtenidos luego de la digestión se resumen en la tabla 5. La figura 9 muestra un gel de agarosa teñido, donde se observan los productos de la digestión para ambos alelos (ancestral y derivado).

IV. 4. RPS4Y: Al igual que los otros marcadores anteriores, este locus se amplifica por PCR y posteriormente se digiere el producto con la enzima *Bsl I*. Los amplificados se incuban con la enzima a una temperatura de 55°C por 3 horas, siguiendo las instrucciones del proveedor y del punto III. Luego se analiza la digestión por electroforesis en un gel de NuSieve-agarosa al 3% (3:1) y se tiñe con bromuro de etidio 0,5mg/ml. Los tamaños obtenidos luego de la digestión se resumen en la tabla 5. En la figura 10 se muestra un gel, donde se aprecian los productos de la digestión para cada alelo.

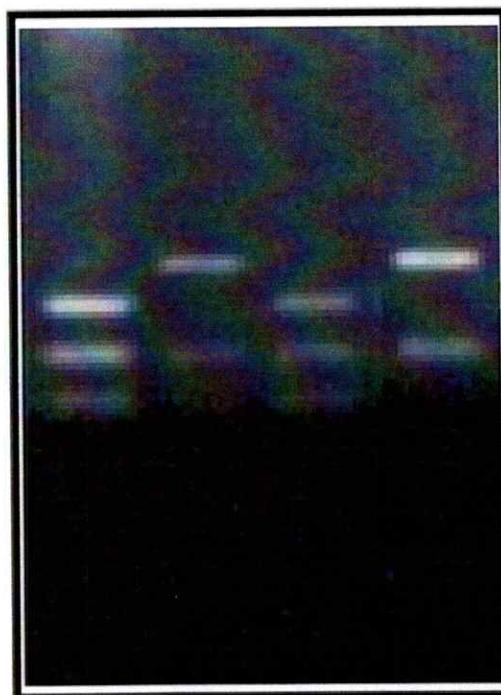
IV. 5. 92R7: Luego de la amplificación por PCR, se digiere el amplificado por 3 horas a 37°C con la enzima *Hind III* siguiendo las indicaciones del proveedor y las del punto III. La resolución de la digestión se realiza por electroforesis en un gel de NuSieve-Agarosa al 4% (3:1) con tampón TAE y luego se tiñe con GelStar 0,5mg/ml, que en contacto con el DNA y siendo sometido a la luz ultravioleta emite una fluorescencia verde. El GelStar se une mejor a los fragmentos pequeños de DNA permitiendo una mejor detección de éstos. Como se muestra en la figura 11, los fragmentos amplificados de este locus presentan digestión parcial en forma recurrente, sin embargo esto no interfiere mayormente con el resultado ya que es fácil distinguir un alelo del otro en la electroforesis. Los tamaños obtenidos después de la digestión se muestran en la tabla 5.

NOMBRE MARCADOR	TAMAÑO AMPLIFICADO	ENZIMA DE RESTRICCIÓN	ALELOS
DYS199	211 pb	<i>Mfe I</i>	Alelo 0 = 211 pb Alelo 1 = 180 y 31 pb
DYS271	209 pb	<i>Nla III</i>	Alelo 0 = 102, 65 y 42 pb Alelo 1 = 144 y 42 pb
RPS4Y	528 pb	<i>Bsl I</i>	Alelo 0 = 234, 154 y 140 pb Alelo 1 = 388 y 140 pb
92R7	55 pb	<i>Hind III</i>	Alelo 0 = 30 y 25 pb Alelo 1 = 55 pb

Tabla 5: Enzimas de restricción utilizadas para el análisis por RFLP en los distintos marcadores polimórficos del tipo SNP estudiados. Para cada uno de estos marcadores bialelicos se indica la enzima de restricción que se utilizó y los tamaños de los fragmentos resultantes después de la digestión tanto para el alelo ancestral (0) como para el alelo derivado (1).

B.

1 2 3 4



← 144 pb
← 102 pb
← 65 pb
← 42 pb

ALELOS 0 1 0 1

A.

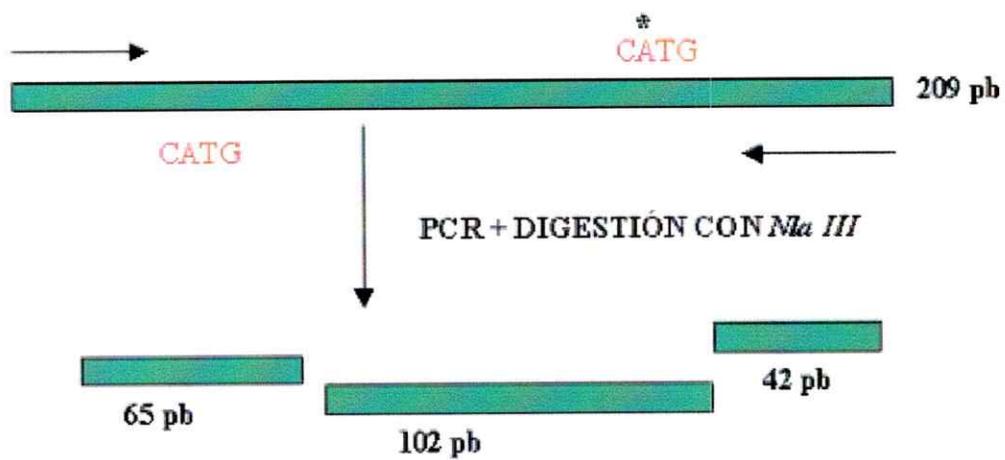
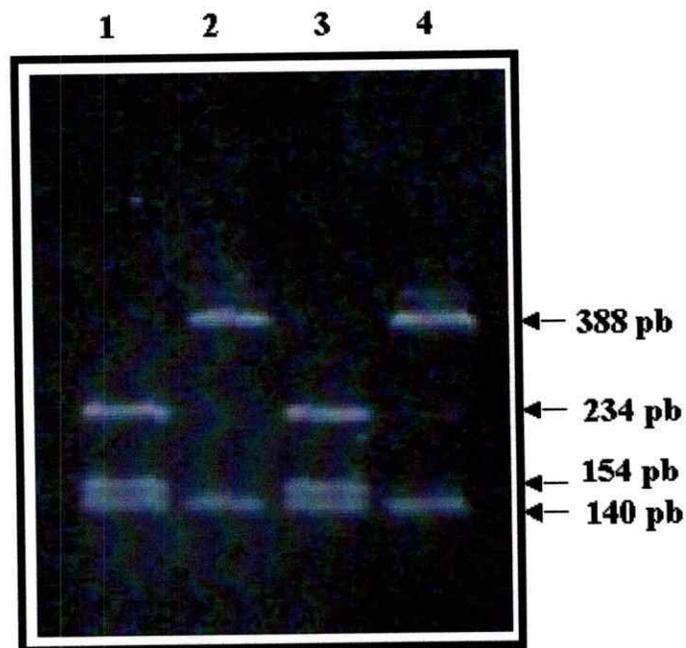


Figura 9: Análisis del marcador polimórfico DYS271 por digestión con *Nla III*. En **B** se observa, el resultado de la electroforesis en gel de agarosa, en el cual se pueden identificar los diferentes alelos. En los carriles 1 y 3 se aprecia la presencia de 3 bandas lo que implica la existencia de 2 sitios de restricción (alelo 0) y en los carriles 2 y 4 se observa que sólo hay 2 bandas lo que implica un solo sitio de restricción (alelo 1). En **A** se muestra un esquema indicando los pasos seguidos para el análisis del locus DYS271. En rojo se muestran los 2 sitios de restricción reconocidos por la enzima *Nla III*, el asterisco muestra el lugar donde ocurre el polimorfismo, el otro sitio de restricción es constitutivo.

B.



A.

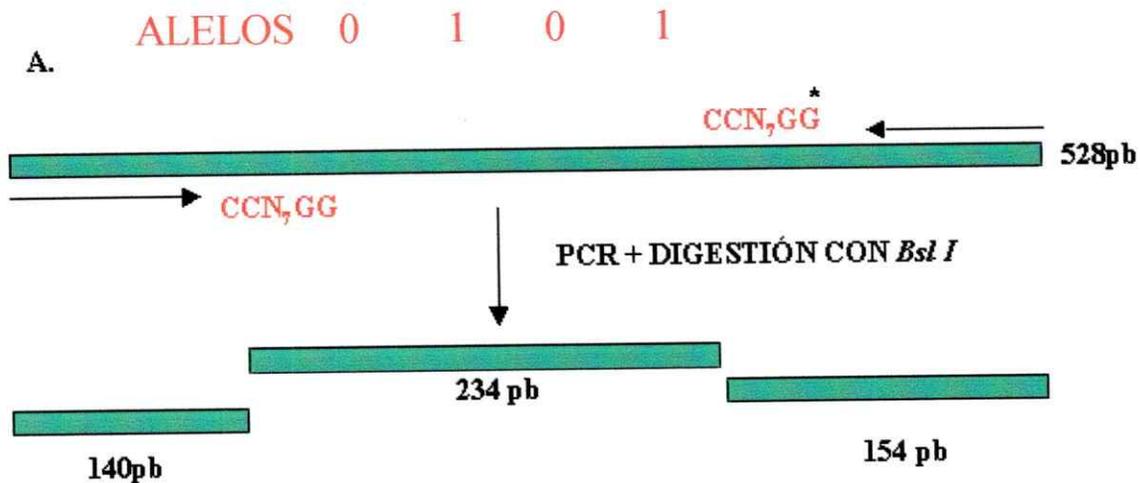


Figura 10: Análisis del marcador Polimórfico RPS4Y por electroforesis en gel de Nusieve-agarosa. En B se muestra el resultado de la electroforesis, en el cual se observa el patrón de digestión en los diferentes alelos. En los carriles 1 y 3 se aprecian 3 bandas lo que implica la presencia de 2 sitios de restricción (alelo 0) y en los carriles 2 y 4 se aprecian 2 bandas lo que implica un solo sitio de restricción (alelo 1). En A se muestra un esquema indicando los pasos seguidos para el análisis del locus RPS4Y. En rojo se muestran los 2 sitios de restricción reconocidos por la enzima *Bsl I*, el asterisco muestra el lugar donde ocurre el polimorfismo, el otro sitio de restricción es constitutivo

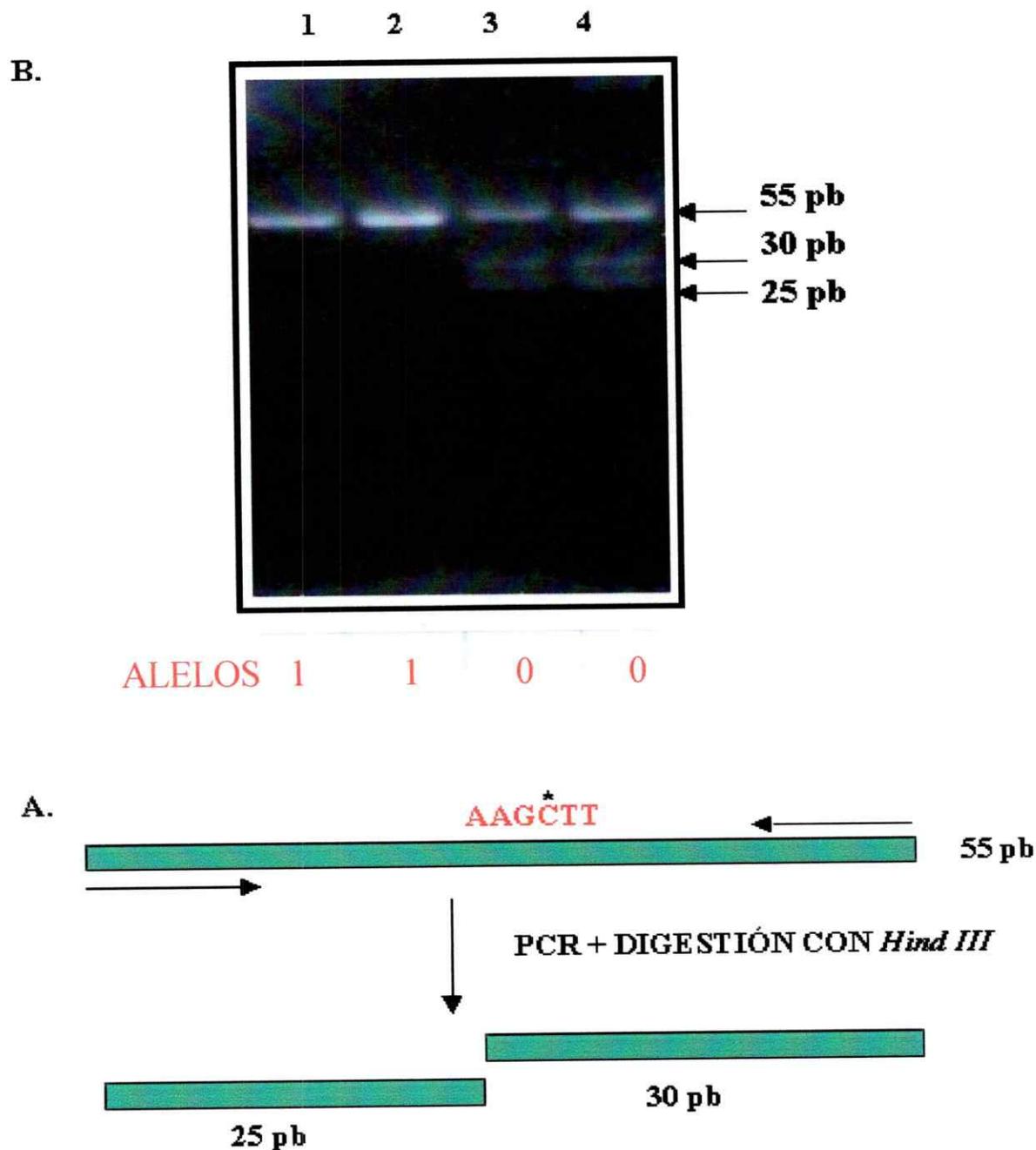


Figura 11. Análisis del marcador polimórfico 92R7 por digestión con *Hind III*.

En **B** se muestra el resultado de la electroforesis, donde se observa el patrón de digestión en los diferentes alelos. En los carriles 1 y 2 se aprecia una sola banda, lo que implica la ausencia del sitio de restricción (alelo 1) y en los carriles 3 y 4 se aprecian 2 bandas lo que implica la presencia del sitio de restricción (alelo 0), además se puede apreciar que existe digestión parcial en este marcador. En **A** se muestra un esquema indicando los pasos seguidos para el análisis del marcador 92R7. En rojo se muestra el sitio de restricción reconocido por la enzima *Hind III*, el asterisco muestra el lugar donde ocurre el polimorfismo.

En la figura 11 se muestra el gel de agarosa teñido, donde se observan los productos de la digestión para ambos alelos.

IV. 6 DYS19: Este marcador corresponde a un locus STR que contiene una secuencia de 4 nucleótidos repetida en tandem, por lo tanto la diferencia de tamaño entre los alelos es de 4 nucleótidos y debe analizarse por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (acrilamida:bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturantes, con urea 7,6 M en tampón TBE. Las dimensiones del gel son 32 cm x 17 cm x 0,4 mm de espesor. Antes de confeccionar el gel se realiza un tratamiento que consiste en agregar a un vidrio 1 ml de una solución de xilano (xilano 0,3%, ac acético 0,5%, etanol 95%), que permite la fijación del gel a éste. Una vez confeccionado el gel, éste es precalentado a 54°C aplicando un voltaje constante de 1500 volts por 30 minutos. A 4µl del producto de PCR se le agregan 4µl de tampón de detención (formamida 95%, EDTA 10mM pH 8, azul de bromofenol 0,1%, xilen cianol 0,1%) se mezcla, se centrifuga y se desnatura por 5 minutos a 95°C. Luego se coloca, rápidamente, en hielo para evitar una posible renaturación a temperatura ambiente. Finalmente se toman 5 µl y se resuelven por electroforesis, durante 2 horas a un voltaje constante de 1500 volts.

Una vez finalizada la electroforesis se separan los vidrios, permaneciendo el gel pegado a uno de ellos. A continuación se tiñe el gel por el método de tinción con plata. En la figura 12 se muestran como ejemplo algunos de los distintos alelos posibles para este locus. El estándar de tamaño corresponde a una mezcla de 5 alelos (A, B, C, D y E).

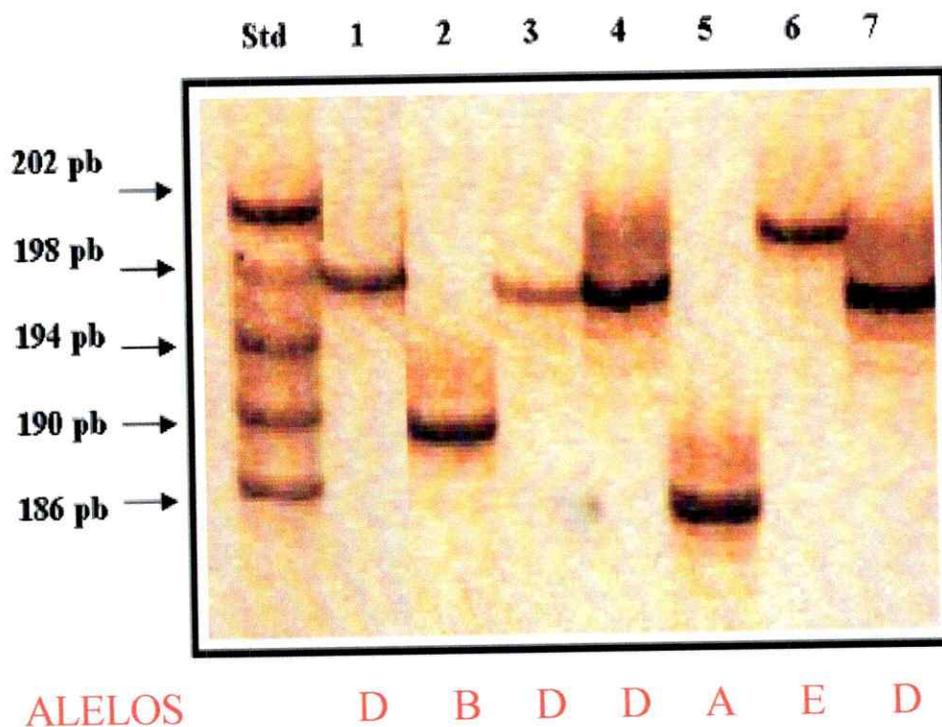


Figura 12. Análisis en gel de poliacrilamida para el marcador polimórfico DYS19. En la figura se muestra el análisis de 5 alelos diferentes para el marcador DYS19. En el carril Std se observa el estándar alelo que consiste en una mezcla de los alelos A, B, C, D y E, que corresponden a 14, 15, 16, 17 y 18 repeticiones del motivo GATA, respectivamente. Este estándar fue preparado en el laboratorio. Al costado izquierdo de la figura se indican los tamaños de los distintos alelos. En el resto de los carriles se observan muestras correspondientes a los distintos alelos; carriles 1, 3, 4 y 7 corresponden al alelo D, carril 2: alelo B, carril 5: alelo A y carril 6: alelo E.

IV. 7. Sistema Alfoide (DYZ3): Se realiza una amplificación por PCR de todas las secuencias alfoides tanto del lado izquierdo del centrómero como del derecho, para lo cual se utiliza un par de partidores descritos en la tabla 2. Luego los amplificados son desnaturados a 95°C por 5 minutos en el termociclador y se dejan renaturar, bajando lentamente la temperatura hasta equilibrarla con la temperatura ambiente. De esta forma, se hace más azarosa la renaturación de la doble hebra y por ende más favorable la formación de heterodobletes. Luego, a 40µl de mezcla de reacción, se le agregan 4 µl de tampón para geles nativos de poliacrilamida HMA 10X (EDTA 20mM, NaCl 1M, Tris pH 7.5 100mM). Posteriormente 40 µl de esta mezcla se someten a electroforesis en un gel de solución MDE 1x (FMC.bioproducts) en tampón TBE, en condiciones nativas. La electroforesis se realiza en tampón TBE a un voltaje constante de 160 volts por 15 horas. Las dimensiones del gel son: 20 cm x 20 cm x 1 mm de espesor. Finalmente se tiñe el gel con plata como se describirá a continuación. En la figura 13 se muestran algunos haplotipos alfoides presentes en la población. Se utilizó el haplotipo alfoide V (carril 1 figura 13 A y carril 4 figura 13 B) como estándar ya que presenta 6 bandas que se encuentran en diversas combinaciones en otros haplotipos. En total se han descrito hasta el momento 53 haplotipos alfoides diferentes.

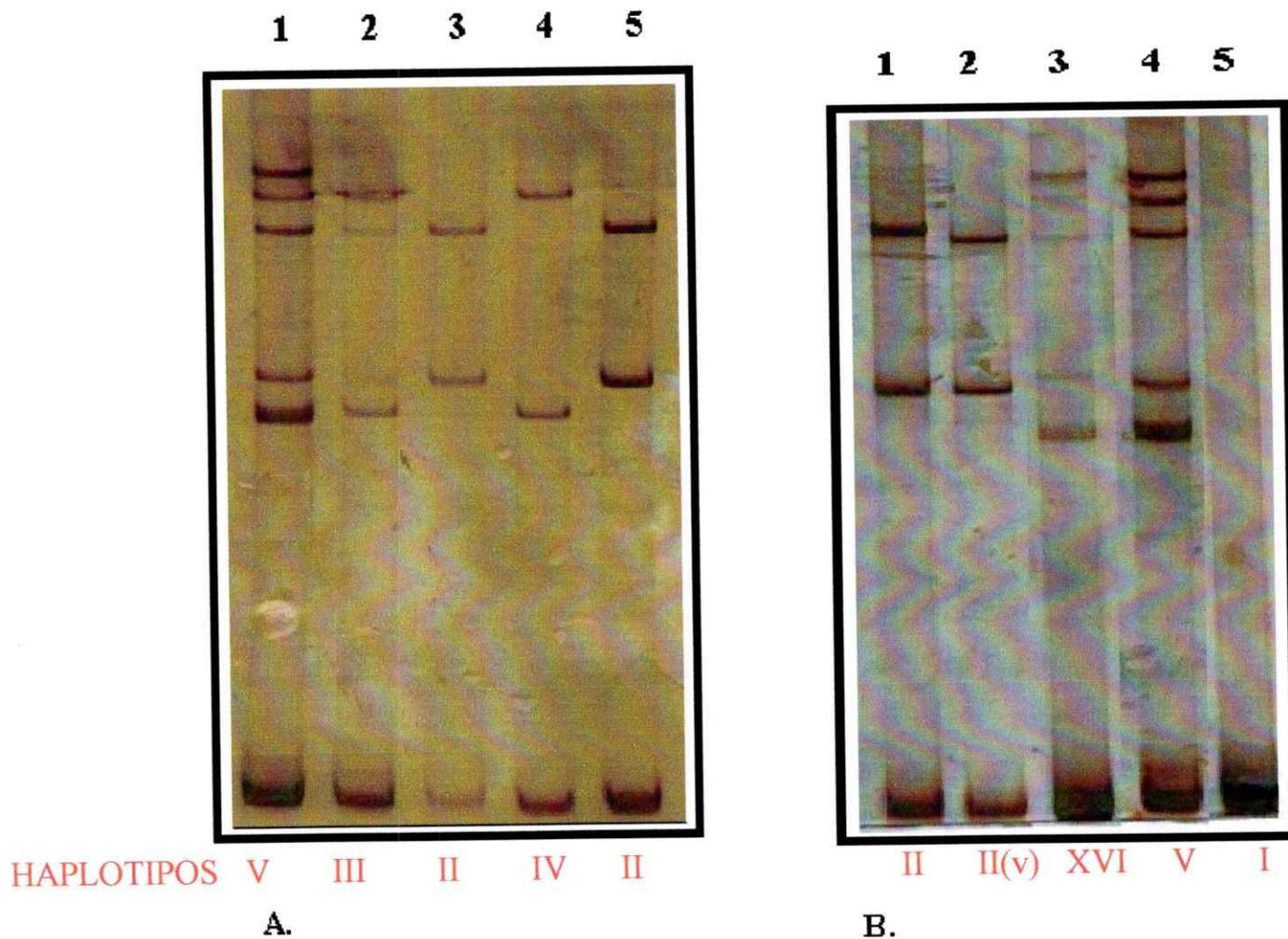


Figura 13. Análisis de los haplotipos del sistema alfoide por electroforesis en gel de MDE. En ambas figuras se observan los distintos haplotipos del sistema alfoide encontrados en el presente trabajo. En **A** se aprecian los haplotipos II, III, IV y V este último fue utilizado como estándar y corresponde a un individuo caracterizado previamente. En el carril 1 se muestra el haplotipo V; carril 2: el haplotipo III; carriles 3 y 5: el haplotipo II y carril 4: el haplotipo IV;. En **B** se aprecian los haplotipos I, V, XVI, II y una variable del II aún no descrita, denominada II(v). En el carril 1 se observa el haplotipo II(v); carril 2: el haplotipo II; carril 3: el haplotipo XVI; carril 4: el haplotipo V y carril 5: haplotipo I. En la parte inferior de ambos geles se pueden ver los dobletes homólogos.

V. TINCIÓN CON PLATA

Luego de separar los vidrios, el gel se lava brevemente con agua destilada, se incuba con agitación por 5 minutos en etanol 10% para fijar el DNA, y se lava en agua. Luego se incuba con agitación por 5 minutos en ácido nítrico 1% para la oxidación del gel, se repite el lavado con agua y se incuba por 30 minutos con agitación en una solución de nitrato de plata 0,2% para la tinción. Posteriormente se lava el gel con agua y se revela con agitación en una solución de carbonato de sodio 280 mM y formaldehído 0,5%. Se lava brevemente y se detiene la reacción de revelado incubando al menos por 5 minutos en ácido acético 1% que además fija la tinción.

RESULTADOS

Con el propósito de conocer, a través de líneas paternas, la composición y estructura de las cinco poblaciones estudiadas, se analizaron cinco o siete marcadores polimórficos (según la población) de la región no recombinante del cromosoma Y. Existe un gran número de loci polimórficos, en particular los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) y los STR (Short Tandem Repeats), descritos y estudiados para el cromosoma Y lo que facilita el estudio genético-poblacional. Es así como la combinación de los distintos alelos de cada uno de los marcadores estudiados, resulta en un haplotipo que puede ser característico de alguna determinada población geográfica. De esta forma podemos estimar cuales serían las posibles mezclas étnicas u orígenes de las distintas poblaciones analizadas y discutir su concordancia con lo descrito por la historia.

I. DETERMINACION DE HAPLOTIPOS DEL CROMOSOMA Y; Y SUS FRECUENCIAS EN POBLACIONES ABORÍGENES CHILENAS CONTINENTALES

Se analizaron 42 individuos de sexo masculino pertenecientes a tres poblaciones aborígenes chilenas continentales, lo que incluye a 22 Pehuenches, 14 Mapuches y 6 Yamanas. Los resultados se analizan para cada una de las poblaciones por separado.

I. 1. Población Yamana

En esta población se analizaron sólo 6 individuos ya que es un grupo étnico que se encuentra muy aislado al extremo Sur de Chile, y en rápida extinción. En La tabla 6 se resumen los haplotipos encontrados para estos 6 individuos y sus frecuencias. Se observa que la población Yamana analizada, al menos un 50% de los individuos estudiados, presentan el haplotipo YAP-/ DYS199C/ DYS271A/ DYS19B/ α h II (-/ C/ A/ B/ II) característico de

poblaciones Caucásicas ó Europeas. Además se encontró un individuo que tiene el haplotipo - / C/ A/ B/ III, que ha sido descrito en grupos de origen Europeo, pero hay evidencias que apuntan a que también se ha encontrado en China (Dr. Fabricio Santos, comunicación personal). Si pensamos en el origen de los inmigrantes que han llegado a Chile que son principalmente Europeos, entonces es más factible pensar que este haplotipo, tiene un origen Europeo. En resumen hay un 66,7% de procedencia Caucásica o Europea en está muestra de esta población aborigen patagónica. Sólo se encontró un individuo que tiene el haplotipo Amerindio mayoritario definido en la literatura (-/ T/ A/ A/ II) y otro que tiene un haplotipo de origen desconocido ó indeterminado (-/ C/ A/ D/ IV).

I. 2. Población Pehuenche

Como se muestra en la tabla 7, de los 22 individuos Pehuenches analizados un 72,7% resultó tener un cromosoma Y con el haplotipo YAP-/ DYS199T/ DYS271A/ DYS19A/ α h II (-/ T/ A/ A/ II), lo que corresponde al haplotipo Amerindio mayoritario descrito por la literatura (Bianchi y col., 1997; Bravi y col., 1997; Pena y col., 1995). Además un 9% de los individuos presentan haplotipos -/ T/ A/ B,C/ II que también es característico de Amerindios. En resumen la muestra analizada de esta población tiene alrededor de un 82% de origen Amerindio por línea paterna. Por otro lado se encontró un 13,6% con el haplotipo -/ C/ A/ B/ II que corresponde a un haplotipo muy común en individuos de origen Caucásico ó Europeo (Bianchi y col., 1997; Santos y col., 1996b). Por último se encontró un individuo de haplotipo +/ C/ A/ B/ V, el origen de este haplotipo aún no está determinado, podría provenir de Europa, del Medio Este, Africa ó Asia (Bravi y col., 2000).

YAP	DYS199	DYS271	DYS19	ALFOIDE	Nº	%	Procedencia
-	C	A	B	II	3	50	Caucásico o Europeo
-	C	A	B	III	1	16,7	Caucásico o Europeo
					4	66,7	TOTAL Cau o Eu
-	T	A	A	II	1	16,7	Amerindio
-	C	A	D	IV	1	16,7	Indeterminado

N = 6 Individuos

Tabla 6: Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Yamana. En la tabla se muestra la variedad de combinaciones de los alelos de los diferentes marcadores polimórficos (haplotipos). Se indica el número de individuos (N), los marcadores estudiados, el porcentaje correspondiente por grupo y la procedencia estimada de cada haplotipo. Las celdas coloreadas indican los marcadores alélicos esenciales para la determinación de la procedencia del haplotipo.

YAP	DYS199	DYS271	DYS19	ALFOIDE	Nº	%	Procedencia
-	T	A	A	II	16	72,7	Amerindio
-	T	A	B	II	1	4,5	Amerindio
-	T	A	C	II	1	4,5	Amerindio
					18	81,8	TOTAL Amerindio
-	C	A	B	II	3	13,6	Caucásico o Europeo
+	C	A	B	V	1	4,5	Asia, Africa o Europa

N = 22 Individuos

Tabla 7: Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Pehuenche. En la tabla se muestra la variedad de combinaciones de los alelos de los diferentes marcadores polimórficos (haplotipos). Se indica el número de individuos (N), los marcadores estudiados, el porcentaje correspondiente por grupo y la procedencia estimada de cada haplotipo. Las celdas coloreadas indican los marcadores alélicos esenciales para la determinación de la procedencia del haplotipo.

I. 3. Población Mapuche

En esta muestra de la población mapuche de la Isla Huapi, a pesar de haberse analizado sólo 14 individuos se encontraron 6 haplotipos diferentes cuyos porcentajes y posibles procedencias están resumidos en la tabla 8. Como se puede apreciar en dicha tabla se encontraron los mismos haplotipos Amerindios descritos en la población anterior con la única diferencia de que el haplotipo -/ T/ A/ B/ II es el que tiene la mayor frecuencia con un porcentaje de 35,7%. En resumen en la muestra de la población Mapuche estudiada se encontró un 64,3% de origen paterno Amerindio. Por otro lado el haplotipo Europeo -/ C/ A/ B/ II se encontró en un 14,3%. Además se encontró un individuo que tiene el haplotipo -/ C/ A/ B/ III, que también fue encontrado en la población Yamana y como se explicó ahí, lo más probable es que este haplotipo tenga un origen Europeo, de esta manera el porcentaje de procedencia Caucásica o Europea en la población asciende a un 21,4%. Finalmente se encontró el haplotipo +/ C/ G/ C/ IX en 2 individuos de esta población. Este haplotipo es de procedencia Africana, debido a que la combinación YAP+/ DYS271 G/ α h V, es característica de poblaciones Africanas (Bravi y col., 2000) y más específicamente de la región del sur del desierto del Sahara, ya que el alelo derivado (G) del marcador DYS271 es exclusivo de esta región (Seielstad, M y col., 1994).

YAP	DYS199	DYS271	DYS19	ALFOIDE	Nº	%	Procedencia
-	T	A	A	II	3	21,4	Amerindio
-	T	A	B	II	5	35,7	Amerindio
-	T	A	C	II	1	7,1	Amerindio
					9	64,3	TOTAL Amerindio
-	C	A	B	II	2	14,3	Caucásico o Europeo
-	C	A	B	III	1	7,1	Caucásico o Europeo
					3	21,4	TOTAL Cau o Eu
+	C	G	C	IX	2	14,2	Africano

N = 14 Individuos

Tabla 8: Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Mapuche. En la tabla se muestra la variedad de combinaciones de los alelos de los diferentes marcadores polimórficos (haplotipos). Se indica el número de individuos (N), los marcadores estudiados, el porcentaje correspondiente por grupo y la procedencia estimada de cada haplotipo. Las celdas coloreadas indican los marcadores alélicos esenciales para la determinación de la procedencia del haplotipo.

II. DETERMINACION DE HAPLOTIPOS DEL CROMOSOMA Y, Y SUS FRECUENCIAS EN LA POBLACIÓN DE SANTIAGO

Se analizaron 45 individuos de sexo masculino de una población de Santiago que ha sido utilizada para diversos estudios genéticos en nuestro laboratorio. Los resultados presentados en la tabla 9 muestran los 13 diferentes haplotipos encontrados y el porcentaje de cada uno de ellos. El análisis del sistema alfoide en este grupo reveló la presencia de un patrón de migración de bandas muy parecido al haplotipo α h II pero con la banda superior levemente más arriba. Este haplotipo se encontró en dos individuos y se definió como α h II(v), que significa que son una variante del haplotipo alfoide α h II que aún no se ha descrito como un haplotipo alfoide único y tampoco ha sido molecularmente caracterizado.

En este grupo, sólo 6 individuos presentan los haplotipos Amerindios clásicos definidos anteriormente, o sea, YAP-/ DYS199T/ DYS271A/ DYS19A, B ó C/ α h II (-/ T/ A/ A, B ó C/ II). Además otros 4 individuos presentan el haplotipo YAP-/ DYS199C/ DYS271A/ DYS19A/ α h II (-/ C/ A/ A/ II). Este es un haplotipo también definido como Amerindio, ya que la combinación DYS19A/ α h II se ha encontrado muy frecuente en este grupo étnico y no así en el resto de las poblaciones (Bianchi y col., 1997; Pena y col., 1995; Ruiz-Linares y col., 1999). En resumen los 10 individuos mencionados que representan un 22,2% de la muestra de la población de Santiago estudiada, tienen un origen paterno Amerindio. Por otro lado se encontraron 30 individuos con haplotipos definidos como Caucásicos, de los cuales 23 son de haplotipo -/ C/ A/ B, C/ II, que están definidos en la literatura como Europeos (Santos, Bianchi y col., 1996; Bianchi y col., 1997), 2 individuos con el haplotipo -/ C/ A/ B/ II(v) que es considerado un derivado del anterior, por lo tanto también puede ser considerado como Europeo, y por último 5 individuos con los haplotipos -/ C/ A/ B, C/ III, que por las mismas

YAP	DYS199	DYS271	DYS19	ALFOIDE	Nº	%	Procedencia
-	C	A	B	II	20	44,4	Caucásico o Europeo
-	C	A	C	II	3	6,7	Caucásico o Europeo
-	C	A	B	II (v)	2	4,4	Caucásico o Europeo
-	C	A	B	III	4	8,9	Caucásico o Europeo
-	C	A	C	III	1	2,2	Caucásico o Europeo
					30	66,6	TOTAL Cau o Eu
-	T	A	A	II	4	8,9	Amerindio
-	T	A	B	II	1	2,2	Amerindio
-	T	A	C	II	1	2,2	Amerindio
-	C	A	A	II	4	8,9	Amerindio
					10	22,2	TOTAL Amerindio
+	C	A	A	XVI	2	4,4	Afroíbero (árabe)
-	C	A	B	I	1	2,2	Indeterminado
-	C	A	C	I	1	2,2	Indeterminado
-	C	A	C	IV	1	2,2	Indeterminado
					3	6,6	TOTAL Indeterminado

N = 45 Individuos

Tabla 9: Distribución de haplotipos del cromosoma Y en la población Santiago. En la tabla se muestra la variedad de combinaciones de los alelos de los diferentes marcadores polimórficos (haplotipos). Se indica el número de individuos (N), los marcadores estudiados, el porcentaje correspondiente por grupo y la procedencia estimada de cada haplotipo. Las celdas coloreadas indican los marcadores alélicos esenciales para la determinación de la procedencia del haplotipo.

razones señaladas para poblaciones aborígenes son considerados como caucásicos. En total en la muestra estudiada de la población de Santiago hay aproximadamente un 66,6% de los individuos de procedencia Caucásica ó Europea. Además se encontraron 2 individuos (4,4%) que tienen el haplotipo +/ C/ A/ A/ XVI, que ha sido descrito en poblaciones del Norte de Africa como también en poblaciones de la península Ibérica. La mayoría de estos individuos son de origen Árabe (Dr. Fabricio Santos, comunicación personal), por lo tanto, es posible que los individuos de Santiago tengan una procedencia paterna Árabe, lo que será discutido más adelante. Cabe destacar que el haplotipo alfoide XVI combinado con el alelo A del locus DYS19 también ha sido encontrado en otros estudios de poblaciones mixtas actuales de Latinoamérica (Santos y col., 1996b). Por último se hallaron 3 haplotipos de procedencia aún desconocida o indeterminada.

III. DETERMINACION DE LOS HAPLOTIPOS DEL CROMOSOMA Y, Y SUS FRECUENCIAS EN LA POBLACIÓN DE ISLA DE PASCUA

En este caso particular se analizaron 7 marcadores polimórficos agregando a los anteriormente descritos el marcador bialélico RPS4Y, cuyo alelo derivado se ha descrito en poblaciones de Polinesia, Melanesia y el Este Asiático (Bergen y col., 1999; Karafet y col., 1999).

Los resultados se resumen en la tabla 10, en la cual se observa que el 85% de la muestra de la población masculina de la Isla de Pascua tiene el haplotipo YAP-/ DYS199C/ DYS271A/ 92R7C/ RPS4YT/ DYS19D, E/ α h V (-/ C/ A/ C/ T/ D, E/ V). El hecho de que estos individuos presenten el alelo derivado del marcador RPS4Y, sugiere fuertemente que este haplotipo tiene su origen en el este de Asia o en la Melanesia. Sin embargo, no existen antecedentes en la literatura que hablen acerca de haplotipos exclusivamente Asiáticos o Melanesios, por lo cual el origen de este haplotipo no puede asegurarse. Además se encontraron 2 individuos que tienen haplotipo YAP-/ DYS199C/ DYS271A/ 92R7T/ RPS4YC/ DYS19B/ α h II (-/ C/ A/ T/ C/ B/ II), que es muy frecuente en poblaciones Europeas o Caucásicas. Cabe señalar que este haplotipo posee el alelo derivado del marcador 92R7, que es muy característico de las poblaciones Europeas (Mitchell y col., 1997), lo que corrobora aún más la procedencia estimada. Para finalizar se encontró un individuo con haplotipo YAP+/ DYS199C/ DYS271A/ 92R7C/ RPS4YC/ DYS19A/ α h V (+/ C/ A/ C/ C/ A/ V), que al contener el alelo YAP+ permite sugerir una procedencia desde Asia, Africa ó Europa, o sea aún no bien definida.

Estos resultados en la población de Isla de Pascua, son muy interesantes porque dan una pequeña idea acerca de su origen y además nos entregan información acerca de como ha

DISCUSION

Un hecho común para todas las poblaciones aborígenes Chilenas analizadas en este trabajo, es el bajo número de individuos que se pudo analizar en cada grupo. Esto se debe a diversas razones. En primer lugar el difícil acceso a las muestras de sangre en poblaciones aborígenes, debido a problemas culturales. Esto nos ha obligado a estudiar muestras que han sido tomadas en el curso de proyectos anteriores y guardadas a -20°C . Como segundo punto debo destacar que se han escogido individuos de sexo masculino para este estudio y que no sean parientes en 1^{er} grado, disminuyendo aún más el número de individuos disponibles.

De las 3 poblaciones aborígenes Chilenas continentales analizadas, los Pehuenches fueron los que presentaron el mayor porcentaje (82%) de cromosomas Y con haplotipos Amerindios, seguido de los Mapuches de Isla Huapi que presentaron 64,3% de estos haplotipos. Hay que mencionar que las poblaciones Pehuenche y Mapuche han permanecido relativamente aisladas por lo que es esperable que hayan conservado un gran porcentaje de haplotipos Amerindios. Este resultado concuerda con otros estudios en poblaciones aborígenes Americanas en los cuales se ha encontrado que más de un 70% de los individuos tienen haplotipos Amerindios. Además en el trabajo de tesis de C. Morales (1999), en el cual se analizó una población Aymara, se encontró que el 62% de los individuos tiene un haplotipo Amerindio. Tanto estos antecedentes, como los resultados encontrados en el presente trabajo reafirman el origen étnico de algunos haplotipos definidos en la literatura como Amerindios.

La población Yamana mostró el mayor porcentaje de haplotipos Europeos. Esto se puede explicar debido a que esta población ha estado últimamente sometida al contacto con hombres caucásicos y por lo tanto, al menos por el lado paterno esta población no es 100%

aborigen. Además este grupo presenta una alta diversidad, ya que a pesar de que sólo se analizaron 6 individuos se encontraron 4 haplotipos diferentes. Por otro lado a pesar de que las poblaciones Pehuenche y Mapuche analizadas se encuentran geográficamente bien aisladas de otras poblaciones, se identificaron individuos con cromosomas Y de origen Europeo, hecho que se puede explicar por una posible mezcla reciente con individuos hombres caucásicos o por mezcla con Españoles durante la conquista.

Resulta muy interesante el hecho de que de los 22 Pehuenches analizados, 6 tienen un apellido español, de los cuales 3 tienen un cromosoma Y de origen Caucásico, y los otros 3 de origen Amerindio. Esto se puede explicar por una falsa paternidad, o por razones socio-culturales, ya que algunos individuos Pehuenches habrían cambiado su apellido para salvar sus vidas durante la conquista. Esto último demuestra que no siempre el apellido de un individuo coincide con su origen étnico paterno y que por ende este tipo de análisis del cromosoma Y es muy útil para estos fines.

Otro hecho que llama la atención tiene relación con la presencia de cromosomas Y con haplotipos Africanos en la población Mapuche de la Isla Huapi. Según cuenta la historia, durante la conquista, unos pocos esclavos negros traídos por los Españoles, fueron reclutados por el ejército para luchar contra los Mapuches en la guerra de Arauco. Se piensa que todos murieron en la guerra o debido al clima frío al que no estaban acostumbrados. Además se sabe que los Africanos traídos a América por los Españoles, provenían básicamente de 4 lugares: Archipiélago de Cabo Verde, Isla Santa Elena, Angola y del Golfo de Guinea (Bethell 2000). Estas son regiones del oeste de África, la mayoría de ellas al Sur del desierto del Sahara. Por otro lado, los haplotipos Africanos encontrados en esta población Mapuche, tienen el alelo derivado del marcador DYS271 que es característico de poblaciones africanas del sur del Sahara. A partir de estos antecedentes y de los resultados encontrados en el presente trabajo se

puede concluir, que es posible que los esclavos negros se hallan mezclado con mujeres aborígenes mapuches durante la guerra de Arauco y que por ende estos cromosomas Y Africanos aún permanezcan en el patrimonio genético de la población.

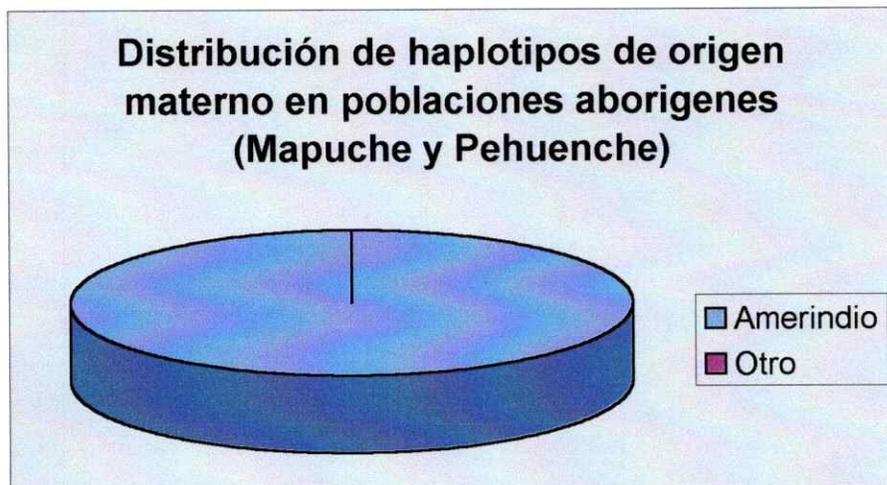
Finalmente hay que señalar que en un trabajo realizado en nuestro laboratorio por Moraga y col.,(2000) donde se analizó el DNA mitocondrial de estas mismas poblaciones, se encontró que todas ellas tienen un 100 % de haplogrupos de mtDNA de origen Amerindio, lo que demuestra que al menos por lado materno no ha habido mezcla con individuos de otras etnias.

En la figura 14 se observa en forma grafica una comparación entre los orígenes étnicos paternos y maternos de las mismas muestras Mapuches y Pehuenches analizadas en el laboratorio. Se aprecia en ambos linajes un origen mayoritario Amerindio pero una mayor diversidad en las líneas paternas.

En la población de Santiago fueron analizados 45 cromosomas Y, y se encontraron 13 haplotipos diferentes, esto dice acerca de la alta diversidad existente en esta población mixta, lo que es absolutamente esperable. La mayoría de la población analizada tiene un cromosoma Y con haplotipo de origen caucásico o Europeo (66,6%) y sólo un 22,2% de la misma tiene un haplotipo de origen Amerindio. Esto evidencia el aporte paterno Europeo entregado, probablemente, por los españoles durante el período del descubrimiento y conquista de América. Cabe señalar que, al igual que en las poblaciones aborígenes analizadas, se encontraron algunos individuos con apellidos españoles pero con haplotipos de origen Amerindio, lo más probable es que los antepasados de estos individuos hallan cambiado su apellido para no ser muertos durante la conquista u otras razones.

Según lo descrito por la historia, durante el descubrimiento y la conquista de Chile, más del 60% de los españoles que llegaron a esta tierra provenían de las regiones de

a.



b.

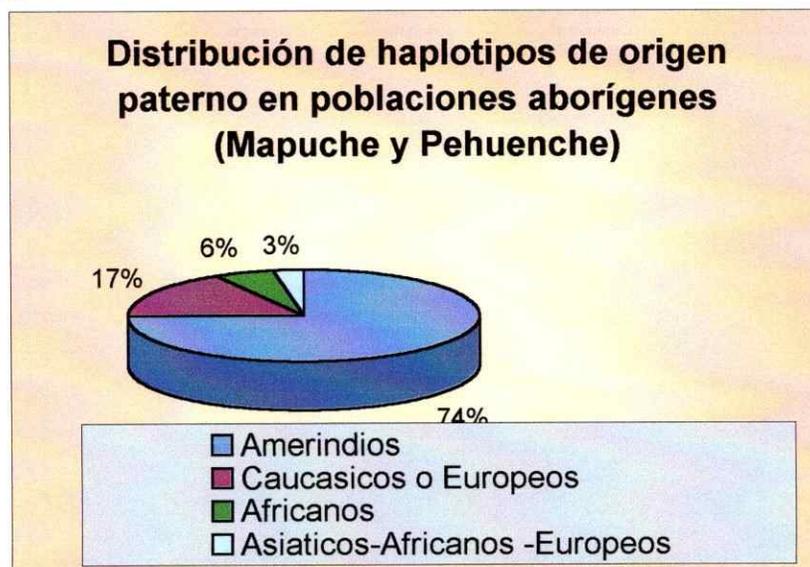


Figura 14.- Distribución Materna (a) y Paterna (b) de la Etnicidad de las Poblaciones Aborígenes Chilenas (Mapuches y Pehuenches). Se observa en forma grafica una comparación entre los orígenes étnicos paternos y maternos de las mismas muestras Mapuches y Pehuenches analizadas en el laboratorio. Se aprecia en ambos linajes un origen mayoritario Amerindio pero una mayor diversidad en las líneas paternas.

Andalucía y de Castilla-León (Frías, 1986), por lo que sería conveniente analizar, en la población de Santiago, marcadores bialélicos cuyos alelos derivados sean característicos de esas regiones de España, sin embargo no ha sido descrito hasta el momento ningún marcador polimórfico con esa característica. Sólo se han descrito haplotipos propios de los Catalanes y de los Vascos (Hurles y col., 1999; Lucotte y Hazout., 1996).

Además, en la población de Santiago se encontraron individuos con haplotipos de origen Arabe, ya que son YAP+ y además tienen el haplotipo alfoide α h XVI. Esta combinación es común en poblaciones del Norte de Africa, en el Sur de España y Portugal, (Dr. Fabricio Santos, comunicación personal) y también se ha descrito en una población de Brasilia (Santos y col., 1996b). La presencia de cromosomas Y Arabes en la población de Santiago tiene al menos dos explicaciones. En primer lugar se puede atribuir a la llegada reciente de familias Arabes a nuestra capital, sin embargo ninguno de los individuos con este haplotipo presentan apellidos con este origen. Segundo, considerando el hecho de que España estuvo alrededor de 8 siglos bajo el dominio de los Arabes, es posible entonces, que algunos españoles portadores de un cromosoma Y arábico hallan llegado a nuestra tierra y se habrían mezclado con mujeres aborígenes y de esta forma dicho cromosoma habría entrado al patrimonio genético de nuestra población.

Por otra parte cabe mencionar que en un trabajo previo de tesis realizado por Rocco (1996), en nuestro laboratorio se analizó el DNA mitocondrial de esta misma muestra de la población de Santiago y se encontró que alrededor del 84% de ella presentaban haplotipos mitocondriales de origen Amerindio, mientras que sólo un 16% presentaba un haplotipo con otro origen. Según esto último la población de Santiago tiene un origen materno predominantemente Amerindio. En la figura 15 se observa en forma grafica una comparación

entre los orígenes étnicos paternos y maternos de la misma muestra de la población analizada en el laboratorio. Se aprecia en ambos linajes presentan un origen mayoritario distinto, mientras que el materno es Amerindio el paterno es Caucásico o Europeo, además se observa una diversidad mayor en las líneas paternas. Cabe señalar que en un estudio sobre el origen de linajes maternos en poblaciones mezcladas, realizado en Brasil (Alves-Silva y col., 2000), se encontró que los haplotipos de mtDNA Amerindios, Europeos y Africanos, presentan frecuencias que dependen de la región geográfica y de la población analizada.

En resumen se puede concluir que la población de Santiago tiene un origen materno principalmente Amerindio y un origen paterno predominantemente Europeo. Este hecho es interesante en relación con la historia de Chile, ya que como sabemos durante el período de descubrimiento y conquista hubo constante mezcla entre hombres Españoles y mujeres Mapuches.

Definitivamente la población Rapa Nui muestra una baja diversidad de haplotipos para el cromosoma Y. El haplotipo mayoritario encontrado es YAP-/ DYS199C/ DYS271A/ 92R7C/ RPS4YT/ DYS19D/ α h V que representa un 80% del total de la población analizada. Si analizamos la literatura encontramos que el alelo derivado RPS4Y-T, se encuentra en una alta frecuencia en la Melanesia y en el centro-este de Asia, mientras que en Africanos y Europeos no está presente (Karafet y col., 1999). Además en Amerindios del centro y sur de América este alelo casi no se encuentra (2/500) (Dr. Fabricio Santos, comunicación personal). Otro punto importante, con respecto a este haplotipo mayoritario, es la presencia del alelo D en el locus DYS19. Este alelo tiene una frecuencia de alrededor del 25% en poblaciones del este de Asia (Santos y col., 1996a). Por otra parte el haplotipo alfoide α h V ha sido observado en poblaciones aborígenes asiáticas (Santos y col., 1996b; Santos y col., 1999b). Cabe

a.



b.

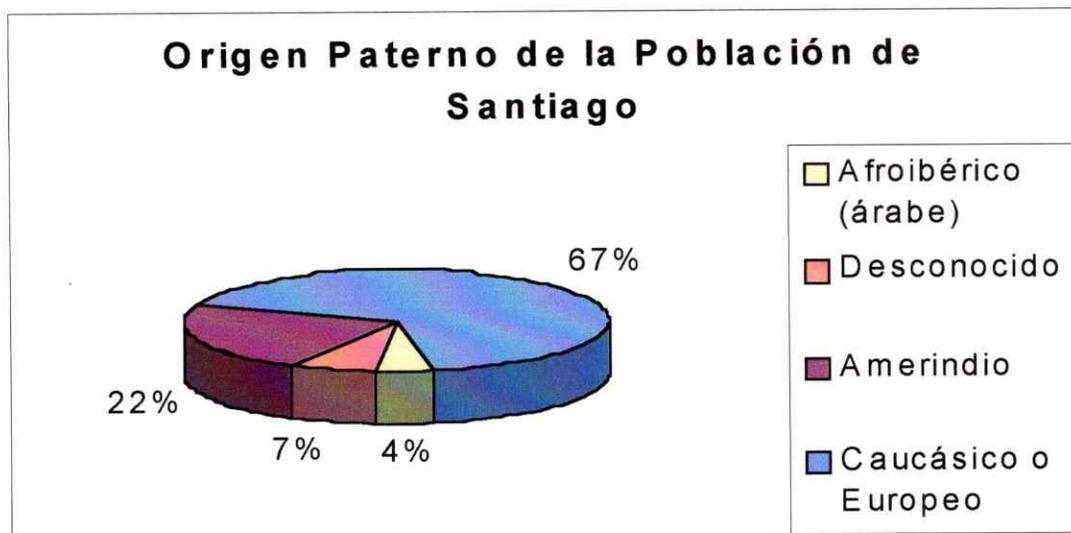


Figura 15.- Distribución Materna (a) y Paterna (b) del origen étnico de la población de Santiago. Se aprecia en ambos linajes presentan un origen mayoritario distinto, mientras que el materno es Amerindio el paterno es Caucásico o Europeo, además se observa una diversidad mayor en las líneas paternas.

mencionar que en algunas poblaciones del centro-este de Asia, como en Mongoles, se ha encontrado una alta frecuencia del haplotipo alfoide α h XVIII que es un derivado directo del α h V, ya que sólo basta un evento mutacional para generar el nuevo haplotipo alfoide (α h XVIII).

Todos los antecedentes mencionados en el párrafo anterior, inducen a pensar que el haplotipo mayoritario encontrado en la población analizada tendría su origen en el centro-este de Asia y en la Melanesia. Para corroborar aún más esto último se sugiere analizar los loci M122 y M119, cuyos polimorfismos consisten en la transición de T \rightarrow C y la transversión A \rightarrow C respectivamente. Los alelos derivados de estos loci son muy frecuentes y altamente exclusivos en poblaciones del este de Asia (Qian y col., 2000; Su y col., 1999; Kayser y col., 2001).

Por otra parte a modo de antecedente es importante señalar que en una investigación realizada por Hurles y col., (1998) en la que se analizaron poblaciones de la Melanesia (Costa de Papua Nueva Guinea) y de la Polinesia (Isla Cook), se encontraron haplotipos que tenían su origen en el este de Asia. Además en un trabajo realizado por Hagelberg y col., (1999), se postula que la Polinesia habría sido poblada a través de una migración que tendría su origen en Asia y que rápidamente se habría expandido hacia el este del Océano Pacífico. En este trabajo se utilizó DNA mitocondrial, marcadores nucleares (HLA) y cromosoma Y. Lo que es más, en un trabajo reciente de Kayser y col., (2000), en el cual se analizaron individuos aborígenes de la Isla Cook, se resolvió que ellos tienen un cromosoma Y de origen Asiático-Melanésico. De esta manera proponen un modelo de expansión lenta desde Asia al resto de las Islas del Pacífico, lo llaman "slow boat model", ya que habría ocurrido por vías marítimas. Para finalizar hay que mencionar que en un trabajo desarrollado en nuestro laboratorio, se

analizó el DNA mitocondrial de 50 individuos de la misma muestra de la Isla de Pascua analizada en este trabajo y se encontró que todos ellos tenían en la región D-Loop una secuencia de nucleótidos llamada "motivo polinésico", específica para poblaciones de este origen.

Tanto los resultados de la Isla de Pascua obtenidos en el presente trabajo como todos los antecedentes mencionados en el último párrafo, reafirman lo expuesto acerca del poblamiento de la Polinesia esquematizado en la figura 1. Es decir los resultados de los análisis de mtDNA y cromosoma Y, inducen a pensar que los colonizadores de la Polinesia provendrían de Asia y Melanesia.

La razón más probable por la cual existe un haplotipo mayoritario tan frecuente en la población de la Isla de Pascua se puede inferir a través de la historia de ésta. Como se sabe la población de la Isla ha sufrido invasiones, pestes, guerras y abusos que han provocado muchos "cuellos de botella", es decir reducciones bruscas en el número de la población seguido de posteriores expansiones poblacionales. Esto hace que un haplotipo levemente mayoritario se haga aún más frecuente, pudiendo llegar a fijarse y que los haplotipos minoritarios casi desaparezcan, por efecto de deriva génica.

Respecto de los haplotipos minoritarios encontrados en esta población Rapa Nui, tenemos el haplotipo YAP-/ DYS199C/ DYS271A/ 92R7T/ RPS4YC/ DYS19B/ α h II, que es sin duda, un haplotipo Caucásico o Europeo, ya que tiene el alelo derivado en el locus 92R7, muy frecuente en poblaciones Europeas, al igual que la combinación DYS19B/ α h II. No es extraño encontrar haplotipos Europeos en la Isla de Pascua, ya que, como sabemos, durante los últimos siglos muchos barcos Europeos desembarcaron en la Isla, con el fin de comercializar. Evidentemente en su mayoría eran hombres caucásicos que se mezclaron con

las isleñas. Es posible que el bajo porcentaje de haplotipos Caucásicos encontrados en la Isla de Pascua sea debido a la selección de los individuos a estudiar, los que se escogieron con al menos 4 apellidos de origen Maorí, apartando de este estudio a posibles individuos de origen Caucásicos, y de origen Chileno continental.

Por último, cabe destacar que no se encontraron haplotipos de origen Amerindio en la población Pascuense analizada y no se ha descrito en la literatura ninguna evidencia genética de mezcla entre isleños y Amerindios. Esto sugiere que al menos previo al descubrimiento de la Isla en 1722, no hubiese ocurrido un contacto étnico importante entre los habitantes de la Isla de Pascua y los Amerindios continentales, contradiciendo, de esta manera, lo que algunas teorías afirman (Heyerdahl, 1950).

Los marcadores polimórficos del cromosoma Y analizados en este trabajo fueron bien escogidos, ya que todos ellos definen haplotipos que son característicos de determinadas etnias. Sin embargo constantemente se están describiendo nuevos marcadores que definen otros haplotipos o que caracterizan aún más los ya existentes. Además cabe señalar que se están buscando marcadores bialélicos, cuyos alelos derivados sean exclusivos de ciertas etnias como es el caso de la raza caucásica y de algunas poblaciones asiáticas, entre otras.

El estudio del cromosoma Y tiene grandes proyecciones en el campo de la medicina forense y la criminalística. La utilización de los marcadores de rápida evolución, como los microsatélites permiten la identificación de individuos que están paternalmente relacionados. Hasta el momento se han descrito más de 10 marcadores microsatelitales en el cromosoma Y los que serán de gran utilidad en el futuro. Un campo donde se puede aplicar este tipo de análisis lo constituyen los estudios de origen genealógico. El cromosoma Y es heredado en la mayoría de las culturas junto con el apellido, por lo tanto se puede saber si individuos que comparten el mismo apellido provienen de un ancestro común (Sykes y Irven., 2000). Otra

área donde se puede utilizar este tipo de marcadores es en criminalística, por ejemplo, en casos de violaciones ya que el hombre deja su cromosoma Y en el lugar del crimen. Es así como el análisis del cromosoma Y tiene grandes proyecciones en diversos campos además de poder complementarse con el estudio de otros marcadores tanto del mtDNA como de los autosómicos.

Los objetivos planteados en este trabajo fueron cumplidos, ya que se logró caracterizar las distintas poblaciones analizadas utilizando marcadores polimórficos del cromosoma Y. Así se determinaron los haplotipos más comunes en cada población y se analizó el origen étnico de cada haplotipo. Finalmente estos resultados fueron comparados con los obtenidos en DNA mitocondrial en estas mismas poblaciones.

CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos y la discusión generada se puede concluir que:

- La muestra de la población Pehuenche mostró el mayor porcentaje de haplotipos Amerindios, entre las 3 poblaciones aborígenes Chilenas continentales estudiadas.
- Las muestras de la población Yamana presentaron un mayor porcentaje de haplotipos Europeos lo que sugiere el contacto reciente con individuos caucásicos.
- Los resultados sugieren la mezcla de mujeres mapuches con hombres africanos que posiblemente eran esclavos negros traídos por los españoles durante la conquista.
- Los resultados demuestran que la población de Santiago es el resultado de la mezcla entre mujeres principalmente aborígenes y hombres predominantemente Europeos, posiblemente Españoles.
- La muestra de la población Pascuense mostró un haplotipo mayoritario de origen Asiático y Melanésico. Esto entrega evidencia que apoya la validez de la teoría del poblamiento de la Polinesia, vía Este de Asia- Melanesia- Polinesia hace ya 6.000 años.

REFERENCIAS

- Altheide T, Hammer M (1997) Evidence of a possible Asian origin of YAP+ Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 61: 462-466
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes P, Ferreira A, Bandelt H-J, Pena S, Ferreira V (2000) The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet* 67: 444-461
- Baillet G, Rothhammer F, Carnese F, Bravi C, Bianchi, N (1994) Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *Am J Hum Genet* 55: 27-33
- Batzer M, Arcot S, Phinney J, Alegria-Hartman M, Kass D, Milligan S, Kimpton C, Gill P, Hochmeister M, Ioanou P et al (1996) Genetic variation of recent Alu insertions in human populations. *J Mol Evol* 42: 22-29
- Bergen A, Wang C, Tsai J, Jefferson K, Dey C, Smith K, Park S, Tsai S y Goldman D (1999) An Asian-Native American paternal lineage identified by RPS4Y resequencing and by microsatellite haplotyping. *Ann Rev Hum Genet* 63: 63-80
- Bethell L (2000) *Historia de América Latina. Volumen 4, América Latina Colonial: Población, Sociedad y Cultura. Traductor Amalia Dieguez y Neus Escandell, 1^{era} Edición. Editorial Critica.*
- Bianchi N, Bailliet G, Bravi C, Carnese RF, Rothhammer F, Martínez-Marignac V, Pena S (1997) Origin of Amerindian Y- Chromosomes as Inferred by the Analysis of Six Polymorphic Markers. *Am J Phys Anthropol* 102: 79-89
- Bianchi N, Catanesi C, Bailliet G, Martínez-Marignac V, Bravi C, Vidal-Rioja L, Herrera R, Lopez-Camelo J (1998) Characterization of Ancestral and Derived Y-Chromosome Haplotypes of New World Native Populations. *Am J Hum Genet* 63: 1862-1871
- Bravi C, Sans M, Bailliet G, Martínez-Marignac V, Portas M, Bareto I, Bonilla C, Bianchi N (1997) Characterization of mitochondrial DNA and Y-Chromosome haplotypes in a Uruguayan population of Africa Ancestry. *Hum Biol* 69: 641-652
- Bravi C, Bailliet G, Martínez-Marignac V, Bianchi N (2000) Origin of YAP+ Lineages of Human Y-Chromosome. *Am J Phys Anthropol* 112: 149-158

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A (1994) The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton, NJ

Diamond, J (1999) Guns, Germs and Steel: The Fates of Human Societies. Chapter 17. Speedboat to Polynesia: The history of the Austronesian expansion. Editorial Econo-Clad Books

Frías F (1986) Manual de Historia de Chile. Capítulo III-8: 103-106. Chile en el siglo XVI. 6^{ta} Edición. Editorial Zig-Zag

Grenberg J, Turner C, Zegura S (1986). The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr Anthropol* 4: 477-497

Hagelberg E, Kayser M, Nagy M, Roewer L, Zimdahl H, Krawczack M, Lió P and Schiefenhövel W (1999) Molecular genetic evidence for the human settlement of the Pacific: analysis of mitochondrial DNA, Y chromosome and HLA markers. *Phil Trans R Soc Lond B* 354: 141-152

Hidalgo J, Virgilio F, Niemeyer H, Aldunate del S, C, Mege P (1996). Culturas de Chile. Etnografía. Sociedades indígenas contemporáneas y su ideología. Capítulo 1. Editorial Andrés Bello

Hammer M, Horai S (1995) Y chromosomal DNA variation and the peopling of Japan. *Am J Hum Genet* 56: 951-962

Hammer M (1995) A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature* 378: 376-378

Hammer M, Spurdle A, Karafet T, Bonner M, Wood E, Novelletto A, Malaspina P, Mitchell R, Horai S, Jenkins T, Zegura S (1997) The Geographic Distribution of Human Y Chromosome Variation. *Genetics* 145. 787-805

Heyerdahl T (1950) *Kontiki: across the Pacific by raft*. Rand McNally, Chicago

Hurles M, Irven C, Nicholson J, Taylor P, Santos F, Loughlin J, Jobling M, Sykes B (1998) European Y-Chromosomal Lineages in Polynesians: A Contrast to the Population Structure Revealed by mtDNA. *Am J Hum Genet* 63: 1793-1806

Hurles M, Veitia R, Arroyo E, Armenteros M, Bertranpetit J, Perez-Lezaun A, Bosch E, Shlumukova M, Chambón-Thomsen A, McElreavey, K, Lopez de Munain A, Rol A, Wilson I, Singh L, Pandya A, Santos F, Tyler-Smith, C, Jobling M (1999) Recent Male-Mediated Gene Flow over a Linguistic Barrier in Iberia, Suggested by Analysis of a Y-Chromosomal DNA Polymorphism. *Am J Hum Genet* 65: 1437-1448

Karafet T, Zegura S, Posukh O, Osipova L, Bergen A, Long J, Goldman D, Klitz W, Harahara S, de Knijff P, Wiebe V, Griffiths R, Templeton A, Hammer M (1999) Ancestral Asian Source(s) of New World Y-Chromosome Founder Haplotypes. *Am J Hum Genet* 64: 817-831

Kayser M, Brauer S, Weiss G, Underhill PA, Roewer L, Schiefenhover W, Stoneking M (2000) Melanesian origin of Polynesian Y chromosomes. *Curr Biol* 10: 1237-1246

Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenhövel W, Underhill P and Stoneking M (2001) Independent Histories of Human Y Chromosomes from Melanesia and Australia. *Am J Hum Genet* 68: 173-190

Lucotte G, Hazout S (1996) Y-Chromosome DNA Haplotypes in Basques. *J Mol Evolution* 42: 472-475

Mathias N, Bayés M, Tyler-Smith C (1994) Highly informative compound haplotypes for the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 3: 115-123

Merriwether D, Rothhammer F, Ferrell R (1995) Distribution of four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Anthropol* 98: 411-430

Mitchell R, Earl L, Fricke B (1997) Y-Chromosome Specific Alleles and Haplotypes in European and Asian Populations: Linkage Disequilibrium and Geographic Diversity. *Am J Phys Anthropol* 104: 167-176

Moraga M, Rocco P, Miquel JF, Nervi F, Llop E, Chakraborty R, Rothhammer F, Carvallo P (2000) Mitochondrial DNA Polymorphisms in Chilean Aboriginal: Implications for the peopling of the Southern Cone of the Continent. *Am J Phys Anthropol* 113: 19-29

Morales C (1999) Caracterización de Poblaciones Chilenas utilizando marcadores polimórficos del DNA mitocondrial y del cromosoma Y. Tesis para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Nile R, Clerk C (1996) Part 2. Cultural Atlas of Australia, New Zealand and the South Pacific. Editorial Andromeda Oxford Limited

Pääbo S (1995) The Y chromosome and the origin of all of us (Men), *Science*. 268: 1141-1142

Pena S, Santos FR, Bianchi N, Bravi C, Carnese RF, Rothhammer F, Gerelsaikhan T, Munkhtuja B, Oyunsuren T (1995) A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. *Nature Genet* 11: 15-16

Pena S, Carvalho-Silva D, Santos F (1997) Utilizacao de polimorfismos de DNA do cromossomo Y no estudo do povoamento das Americas. *Revista Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, Junho/ Agosto*, pp 42-55

Qian Y, Qian B, Su B, Yu J, Yu J, Ke Y, Chu Z, Shi L, Lu D, Chu J and Jin L (2000) Multiple origins of Tibetan Y chromosomes. *Hum Genet* 106: 453-454

Rocco P (1996). Polimorfismos de restricción y de secuencia en el DNA mitocondrial de una población mapuche y dos grupos de Santiago. Tesis para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Ruiz-Linares A, Ortiz-Barrientos D, Figueroa M, Mesa N, Múnera JG, Bedoya G, Vélez I, García L, Pérez-Lezaun A, Bertranpetit J, Feldman M, Goldstein D (1999) Microsatellites provide evidence for Y chromosome diversity among the founders of the New World. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6312-6317

Santos F, Pena S, and Epplen J (1993) Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* 335: 1-5

Santos F, Pena S, Tyler-Smith C (1995) PCR haplotypes for the human Y chromosome based on alphoid satellite variants and heteroduplex analysis. *Gene* 165: 191-198

Santos F, Gerelsaikhan T, Munkhtuja B, Oyunsuren T, Epplen J, Pena S (1996a) Geographic differences in the allele frequencies of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19. *Hum Genet* 97: 309-31

Santos F, Bianchi N, Pena S (1996b) Worldwide distribution of human Y chromosome haplotypes. *Genome Res* 6: 601-611

Santos F (1997) The Y alphoid heteroduplex (α h) polymorphic system. Dep. Biol. Geral, Ins. Cs. Biol., Univ. Fed. Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. No Publicado

Santos F, Carvalho-Silva D, Pena S (1999a) Methods and Tools in Biosciences and Medicine; Epplen JT, Lubjuhn T. Chapter 9: 133-152, PCR-based DNA profiling of human Y chromosomes. Editorial Birkhauser Verlag

Santos F, Pandya A, Tyler-Smith C, Pena S, Schanfield M, Leonard W, Osipova L, Crawford M, Mitchell R (1999b) The Central Siberian Origin for Native American Y Chromosomes. *Am J Hum Genet* 64: 619-628

Seielstad M, Herbert J, Lin A, Underhill A, Ibrahim M, Vollrath D, Cavalli-Sforza L (1994) Construction of Human Y-chromosomal haplotypes using a new polymorphic A to G transition. *Hum Mol Genet* 3: 2159-2161

Shurr T, Ballinger S, Gan Y, Hodge J, Merriwether D, Lawrence D, Knowee W, Weiss K, Wallace D (1990) Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet* 46: 613-623

Starikovskaya Y, Sukernik R, Schurr T, Kogelnik A, Wallace D (1998) mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: implications for the genetic history of ancient Beringia and the peopling of the New World. *Am J Hum Genet* 63: 1473-1491

Su B, Underhill P, Deka R, Zhang W, Akey J, Huang W, Shen D, Lu D, Luo J, Chu J, Tan J, Shen P, Davis R, Cavalli-Sforza L, Chakraborty R, Xiong M, Du R, Oefner P, Chen Z, and Jin L (1999) Y Chromosome Evidence for a Northward Migration of Modern Humans into Eastern Asia during the Last Ice Age. *Am J Hum Genet* 65: 1718-1724

Sykes B, Irven C (2000) Surnames and the Y Chromosome. *Am J Hum Genet* 66: 1417-1419

Torrioni A, Schurr T, Yang C, Szathmary E, Williams R, Schanfield M, Troup G, Knowler W, Lawrence D, Weiss K, Wallace D (1992) Native American mitochondrial DNA analysis indicated that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130: 153-162

Underhill P, Jin L, Zemans R, Oefner P, Cavalli-Sforza L (1996) A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 196-200

Ward R, Frazier B, Dew-Jager K, Pääbo S (1991) Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe: *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8720-8724

Whitfield L, Sulston J and Goodfellow P (1995) Sequence variation of the human Y chromosome. *Nature* 378: 379-380