

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

HOJA DE APROBACIÓN

Variación del cromosoma Y en la población afrocostarricense de Limón, Costa Rica.

Tesis para optar por el grado de Licenciatura
con énfasis en Genética Humana

Gerardo Jiménez Arce

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2000

HOJA DE APROBACIÓN

Esta tesis fue aceptada por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado de Licenciado con énfasis en Genética Humana.

Tutor: Dr. Ramiro Barrantes Mesén

RTBL

Asesor : M.Sc. Edward Ruíz Narváez

Edward A. Ruíz Narváez

Asesor: Dr. Mario Chaves Villalobos

Asesor: Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta

Dir. Escuela Biología: M.Sc. Hernán Camacho

Sustentante: Bach. Gerardo Jiménez Arce.

Gerardo

DEDICATORIA

Dedicamos

A Edmundo y a los hijos de Edmundo y a los hijos de Edmundo

A Víctor y a los hijos de Víctor y a los hijos de Víctor

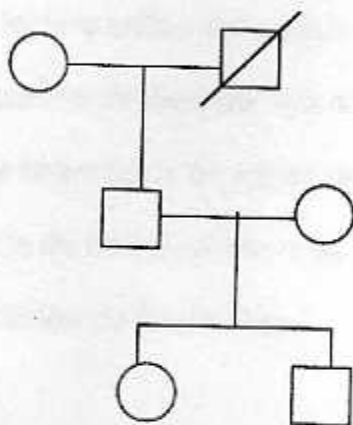
A Jorge y a los hijos de Jorge y a los hijos de Jorge

A los miembros del

Esta institución

522 y a los miembros de

CHATELAIN y a los miembros de



A los aquí representados

INDICE GENERAL

Reconocimientos

A Edward Ruíz por su valiosa ayuda y apoyo en el desarrollo de toda esta tesis.
 A Victor Castillo y Omar Achí por su cooperación en el trabajo de laboratorio.
 A Jorge Lobo por la lectura crítica del manuscrito y sugerencias tan acertadas.
 A los miembros del comité de tesis por sus sugerencias al leer los borradores.
 Esta investigación se financió en su mayor parte con fondos del proyecto 111-97-522 de la Vicerrectoría de Investigación y de la Empresa Auxiliar No. 31 del CIHATA de la Universidad de Costa Rica.

El negro en Costa Rica
 Carcinoma y
 ADN y carnosoma y
 Microsatélites. Teóricamente

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra
 Extracción de ADN
 Transferencia genética
 PCR
 Análisis genético

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE GENERAL

	Página
HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
RECONOCIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
<i>Índice de ilustraciones</i>	vi
<i>Índice de cuadros</i>	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	
Historia	1
El negro en Costa Rica	2
Cromosoma Y	4
ADNmt y cromosoma Y	6
Microsatélites Y-específicos	9
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	
Muestra	16
Extracción ADN	16
Marcadores genéticos	17
PCR	19
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	45

Índice de ilustraciones:

	Página
<i>Figura 1. Representación esquemática del cromosoma Y</i>	5
<i>Figura 2. Frecuencias alélicas</i>	25
<i>Figura 3 (A y B). Análisis de componentes principales</i>	32

Índice de cuadros:

<i>Cuadro 1. Características principales de los microsátélites</i>	18
<i>Cuadro 2. Alelos encontrados</i>	23
<i>Cuadro 3. Frecuencias alélicas</i>	24
<i>Cuadro 4. Alelos más frecuentes en varias poblaciones</i>	27
<i>Cuadro 5. Frecuencias haplotípicas</i>	29
<i>Cuadro 6. Diversidad haplotípica y Número promedio diferenciación</i>	30
<i>Cuadro 7. AMOVA comparando amerindios y afrocaribeños</i>	31
<i>Cuadro 8. AMOVA comparando afrocaribeños y nor-africanos</i>	31
<i>Cuadro 9. Análisis de componentes principales</i>	33

Resumen: Usando seis microsatélites tetranucleotídicos (DYS19, DYS389 a y b, DYS390, DYS391, DYS393) y el locus bialelélico YAP, todos específicos del cromosoma Y, se analizaron 34 varones fenotípicamente negros. Se identificaron 27 haplotipos, de los cuales los más frecuentes fueron el Y8 (20.6%) y el Y9 (5.9%). En general, los microsatélites presentaron de cuatro a seis alelos y frecuencias máximas superiores al 50%. El DYS393 presentó una reducida diversidad nucleotídica, estando el alelo de 13 repeticiones en un 70.6% de los individuos. El YAP dió los dos alelos el YAP+ (79.4%) y el YAP- (20.6%), por ser un grupo negroide de reconocida ancestría africana era de esperar encontrar el YAP+ en mayor proporción. Al comparar los alelos más frecuentes con otras poblaciones (amerindias y africanas), se nota similitud en las frecuencias del alelo de 11 repeticiones con los africanos para el DYS389a, mientras el más frecuente en amerindios para este mismo marcador es el de 10 repeticiones. Se encontró una alta diversidad haplotípica total (96.1%). El AMOVA comparando estos negroides con grupos del noroeste de África, muestra una varianza del 100% dentro de las poblaciones. Sin embargo, el DYS391 y el DYS393 presentaron diferencias significativas en sus valores de R_{st} ($p < 0.001$ análisis de permutación), lo que se podría explicar por ser grupos negroides de distintas regiones que portan diferentes distribuciones haplotípicas. El análisis de componentes principales indica que los marcadores que más influyen en la diferenciación interpoblacional de los haplotipos son el DYS389 a y b, el YAP y el DYS393 que dan una varianza explicada de 30.3%, 23.8% 14.4% y 14.1% respectivamente.

Variación del cromosoma Y en la población afrocostarricense de Limón, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

Historia

Con la llegada de Cristóbal Colón a las costas de Costa Rica en 1502 empieza una nueva y compleja historia genética para el país, ya que antes de eso los únicos habitantes eran los amerindios, quienes estarían mezclados solamente entre sus tribus. Pero con la llegada de Colón y los posteriores conquistadores españoles que vinieron a sus costas, acompañados de sus sirvientes negros, fue cambiando la estructura genética de los habitantes, al irse mezclando entre ellos producto del sometimiento y establecimiento de las primeras poblaciones (Meléndez y Duncan 1972).

La constitución genética de la población de Costa Rica, y en general, de toda Centroamérica, refleja los rasgos genéticos heredados de sus antepasados indígenas y de los inmigrantes africanos, asiáticos y europeos que aquí se establecieron. Por tanto, la investigación en grupos étnicos específicos es de gran interés genético y antropológico ya que provee información sobre la composición génica de los individuos, la composición étnica del país y la influencia migratoria que ha sufrido.

El negro en Costa Rica

Es bien sabido que poblaciones de raza negra y caucásica emigraron a Centroamérica de distintas partes de África, las Antillas y Europa y que la contribución de los amerindios autóctonos a las presentes poblaciones varía mucho de un país a otro debido a los diferentes grados de mezcla racial (Morera-Brenes 1995). Así hay registros que indican que, para el siglo XVII había algo más de 15 000 personas en "la provincia" de Costa Rica entre ellas 330 españoles y unos 300 negros, mulatos y mestizos (Rodríguez 1980). En los siglos siguientes fue aumentando la migración de raza negra destinada a trabajar en la agricultura y proveniente en su mayor parte del Africa Ecuatorial en cuyas costas existían los mercados de esclavos (Meléndez 1981).

En los inicios de Puerto Limón, localizado en la costa Atlántica costarricense, cerca de 1872 se estima que el grupo de negros era de mil trabajadores. Para 1902 hay una nueva oleada migratoria de individuos negros, pero esta vez desde Jamaica motivada por la construcción del ferrocarril y el desarrollo de la actividad bananera en la zona Atlántica del país. Para el censo de 1927 hay un total de 19 136 negros jamaquinos en Costa Rica, de los cuales un 94.1% residían en Limón, representando un 4.1% del total de la población. En 1949 el Gobierno de la República de Costa Rica integró a todos los antillanos de color radicados en el país, a la ciudadanía costarricense, intensificándose así el entrecruzamiento entre las razas. (Meléndez y Duncan 1972).

Así, en estudios de hemoglobinas anormales se ha detectado una alta prevalencia de hemoglobina S (HbS) en la región Atlántica (8.2 %), como también en Guanacaste (7.5%). Varios estudios han mostrado que la presencia en alta frecuencia de esta variante de hemoglobina en poblaciones humanas es propia de zonas endémicas a la malaria sobre todo en el África (Madrigal 1989). Sin embargo, en Costa Rica, se ha apreciado una significativa diferencia en las frecuencias de hemoglobina C (HbC) entre individuos de raza negra de Limón (2.4%) y la población de Guanacaste (0.2%) (Saézn, Chaves y Quintana 1986).

La diferencia en HbC y similitud en HbS, entre los individuos de raza negra de Limón y Guanacaste, se puede deber a que son descendientes de negros de áreas de África diferentes. Así entonces, los negros que se establecieron en Guanacaste, en donde la prevalencia de HbC no es alta, debieron de provenir de zonas africanas donde también es baja la frecuencia de HbC. A diferencia de la inmigración jamaicana que llegó años después contratada para la construcción del ferrocarril y se estableció en Limón, los cuales debían ser descendientes de negros del África Occidental en donde hay una alta frecuencia de HbC (Saézn, Chaves & Quintana 1986).

A la vez, Morera-Brenes (1995) al estimar la mezcla racial de la población costarricense, usando 15 loci de 10 sistemas sanguíneos y cuatro de proteínas del suero, llega a determinar que las proporciones de genes de origen caucásico, amerindio y africano son respectivamente, 61.04%, 29.91% y 9.05% en la población en general. Sin embargo, el análisis por regiones muestra que la zona

Atlántica y Guanacaste presentan un incremento en los genes de ancestría africana, 13.54% y 13.78%, respectivamente.

Por lo tanto, el estudio de grupos étnicos específicos usando diferentes indicadores genéticos, es de gran importancia para la antropología genética, para la genética de poblaciones y para la genética forense, ya que se obtiene un cuadro más completo del flujo génico de las poblaciones ancestrales a las poblaciones actuales.

Cromosoma Y

El cromosoma Y, uno de los más pequeños del genoma humano, es una molécula de ADN lineal, de aproximadamente 60 Mb. Citológicamente, comprende una región de heterocromatina en la parte distal del brazo largo, que es de longitud variable entre individuos, y una parte constante de eucromatina de unos 30 Mb, que comprende las regiones de mayor interés genético (Figura 1).

El cromosoma Y tiene características singulares, que lo hacen idóneo para los estudios de genética de poblaciones: es haploide, es heredado en la vía masculina únicamente, por lo que está sujeto a mutaciones macho-específicas y no se recombina, aunque la región pseudoautosómica es homóloga (Par1 y Par2) y puede recombinar con el cromosoma X (Scozzari *et al.* 1997). Además, el cromosoma Y en su mayor parte, hasta un 60%, consiste de repeticiones en tándem. Estas propiedades permiten, en principio, reconstruir la historia de linajes

paternales al comparar los polimorfismos del cromosoma Y de humanos modernos, construyendo árboles filogenéticos y trazando así la historia poblacional (Jobling *et al.* 1997).

La porción no recombinante del cromosoma Y (NRY) puede estar afectada por un número de procesos evolutivos que son poco comunes en regiones genómicas que están bajo recombinación, por lo que se pueden fijar mutaciones neutras ligadas a variantes seleccionadas.

Dos procesos son los que más afectan la NRY, el arrastre genético que se refiere a la fijación de una mutación ventajosa y la fijación asociada a mutaciones neutras, este efecto depende del coeficiente de selección, de la tasa de evolución adaptativa y de la tasa de recombinación (Wiehe & Stephan 1993). El otro es la selección negativa, que es la eliminación selectiva de mutaciones deletéreas, este efecto depende de la tasa de mutaciones deletéreas para una región dada, del coeficiente de selección y la frecuencia de recombinación. Ambos procesos pueden contribuir a reducir los niveles de polimorfismo nucleotídico en regiones del genoma con poca recombinación (Stephan *et al.* 1998).

Además, la reducida variabilidad en la NRY se puede deber a los relativos pocos genes funcionales y por lo tanto a la baja probabilidad de selección en esta región. Se han caracterizado 20 genes funcionales en los 60Mb de ADN que conforma la NRY humana (Lahn & Page 1997). Además, el tamaño efectivo de la población para la NRY es un cuarto del tamaño efectivo de la población para los

autosomas, con lo cual la eficacia selectiva es más débil al ser la población pequeña (Nachman 1998). Y llegan a ser más pronunciados los efectos aleatorios de la deriva genética.

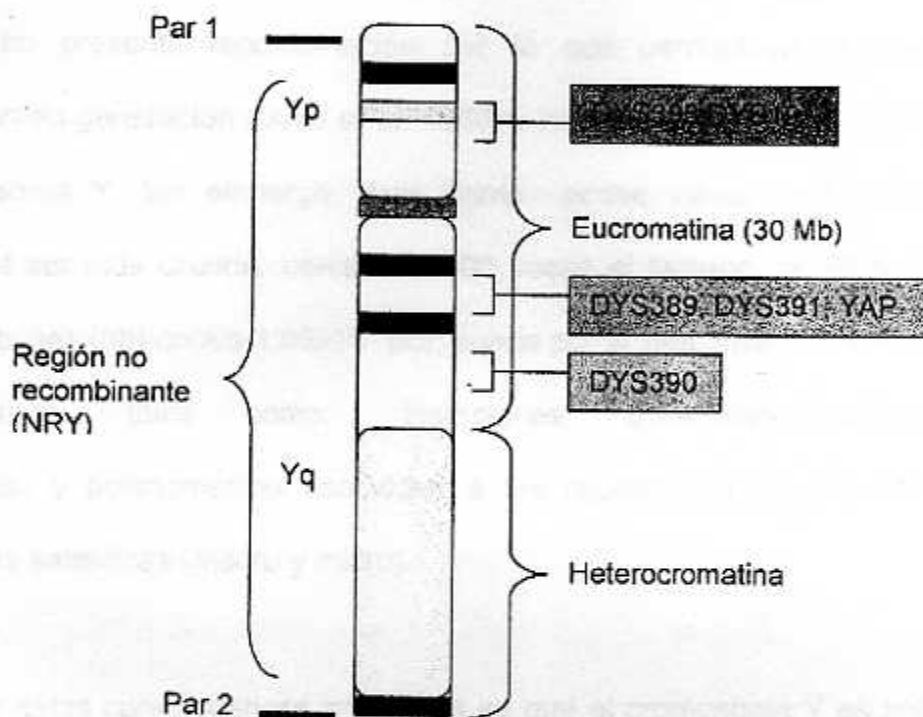


Figura 1. Representación esquemática del cromosoma Y, indicando localización de los loci analizados (Carvalho-Silva et al. 1999).

ADN mt y cromosoma Y

Mientras el cromosoma X y los cromosomas somáticos tienen múltiples ancestros, todos los cromosomas Y modernos tienen un sólo ancestro paterno, igualmente todos los genomas mitocondriales actuales tienen un sólo ancestro materno, por lo que se puede decir que, como contraparte del cromosoma Y se

encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt) el cual es una molécula circular, se conoce su secuencia completa, tiene una alta densidad de genes con poco ADN no codificante, es heredado por la línea materna, es haploide, tiene abundantes polimorfismos ya que presenta una tasa mutacional diez veces mayor que el ADN nuclear, no presenta recombinación por lo que permanece inalterado de generación en generación (Giles *et al.* 1980) y ha sido mucho más estudiado que el cromosoma Y. Sin embargo, este último posee varias ventajas sobre el ADNmt, al ser más grande, cerca de 4000 veces el tamaño del ADNmt (6×10^7 pares de bases (pb) contra 1.65×10^4 pb), puede portar una mayor variedad de polimorfismos tales como: inserciones, deleciones, duplicaciones e inversiones; y polimorfismos asociados a las repeticiones en tándem en las secuencias satelíticas (macro y micro).

Por estas características singulares es que el cromosoma Y es importante para el estudio de genética de poblaciones, principalmente por que es transmitido de padres a hijos sin cambios, excepto por la acumulación gradual de mutaciones (tasa de mutación 5×10^{-7}), lo que permite la reconstrucción de linajes paternos, por comparación de polimorfismos, ya que posee secuencias repetidas en tándem, familias de repeticiones dispersas y secuencias únicas, lo que permite la elaboración de árboles filogenéticos (Scozzari *et al.* 1997, Bianchi *et al.* 1998).

La posibilidad de usar el cromosoma Y para proveer fechas relevantes a la historia humana ha sido usada, primero, porque la diversidad de

secuencias del cromosoma Y humano han sido comparadas con la divergencia de secuencias entre humanos y chimpancés y se ha estimado un tiempo de coalescencia para todos los cromosomas Y humanos de 188 000 años, con un 95% de confianza en un intervalo de 51 000 a 411 000 años (Hammer 1995).

Entonces, al construir árboles filogenéticos que muestran las relaciones entre los haplotipos del cromosoma Y en diferentes poblaciones, permite conocer mejor la historia genética de esos grupos humanos. Así, Jobling, Pandya & Tyler-Smith (1997), demuestran la utilidad de los árboles filogenéticos al comparar la distribución de diferentes haplogrupos del cromosoma Y en diferentes grupos poblacionales, en donde se ve el marcado grado de especificidad poblacional. Por ejemplo, ellos asignan el haplogrupo 8 a África Sub-Sahariana, el haplogrupo 5 a japoneses y el haplogrupo 18 a amerindios de Sur América. Por lo tanto, al analizar poblaciones particulares, se puede encontrar que la mayoría de sus miembros pertenecen a un haplogrupo específico del cromosoma Y con lo que se podría establecer la existencia de sub-estructuración poblacional.

Mientras la alta tasa de sustitución de bases del ADNmt crea problemas, como por ejemplo, no es posible el determinar estados ancestrales entre especies o la tasa mutacional es tan alta que algunas sustituciones pueden revertir o recurrir dentro de linajes humanos; en el cromosoma Y tales sustituciones son

raras por lo que pueden ser consideradas como eventos únicos, y por tanto, los estados ancestrales pueden ser determinados (Jobling & Tyler-Smith 1995). Así entonces, la historia de los cromosomas Y humanos puede ser diferente de la de los ADNmt, por lo que podría reflejar aspectos de la historia poblacional, como prácticas culturales, que gobernaban la estructura de cruces y las diferencias de comportamiento de machos y hembras en migraciones, guerras y colonizaciones. Pero, al complementar con los datos obtenidos de ADNmt y de autosomas se puede aumentar la información en los estudios poblacionales, estudios de biología molecular, genética de poblaciones, estudios evolutivos y análisis forenses y de paternidad (Jobling & Tyler-Smith 1995; Santos & Tyler-Smith 1996; Deka *et al.* 1996; Jobling, Pandya & Tyler-Smith 1997).

Microsatélites Y-específicos

Los genes autosómicos de un ancestro dado son transmitidos a la descendencia en una proporción que disminuye a la mitad por cada generación de acuerdo a la expresión 0.5^n , donde n es el número de generaciones; mientras el ADNmt y el cromosoma Y heredan sus genes a la descendencia de acuerdo a la expresión 1^n , debido a que son sistemas haploides. Y por las características singulares de cada uno de esos ADNs es que se usan para trazar y comparar linajes paternos y maternos en poblaciones humanas.

Entonces, los microsatélites de estos sistemas pueden ser usados para comparar poblaciones. Poblaciones con diferentes distribuciones de microsatélites son distintas. Sin embargo, poblaciones con distribuciones de microsatélites similares no necesariamente son similares. En lo que respecta al cromosoma Y, esto es así porque la evolución convergente puede llevar a diferentes cromosomas Y portando la misma distribución de alelos microsatélites (Hammer 1995). Por lo tanto, la naturaleza convergente de las mutaciones en microsatélites puede oscurecer las verdaderas relaciones filogenéticas de los haplotipos. Por lo que, dos haplotipos pueden ser iguales por estado y no por descendencia, o sea, dos idénticos haplotipos pueden no derivar de un haplotipo ancestral común y un haplotipo puede mutar a otro por múltiples vías (Hammer 1995).

Hasta un 60% del cromosoma Y consiste de repeticiones largas en tándem, localizadas en el extremo Yq, estas son secuencias de hasta 3.4 kilobases (kb) de la subfamilia satelítica Hae III llamada DYZ1 y de 2.47 kb de la subfamilia satelítica Msp I llamada DYZ2, en donde se encuentran los microsatélites DYS389, DYS390, DYS391 y el YAP. Otro grupo de secuencias cortas se hallan en el extremo Yp, por ejemplo las DYZ4 y DYZ5, aquí se ubican los microsatélites DYS393 y DYS19 (Figura 1). La mayoría de estos polimorfismos pueden ser detectados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Roewer *et al.* 1992; Santos, Pena & Tyler-Smith 1995).

Por ser la duplicación del ADN durante la gametogénesis masculina excepcional, ha llevado a la predicción de que la tasa mutacional del cromosoma Y sea más elevada que la del resto del genoma nuclear. Esto es así, porque la producción de espermatozoides se realiza más constantemente y conlleva más divisiones celulares que en las células somáticas, con lo que se aumenta el potencial mutagénico durante la replicación de su ADN.

Sin embargo, hay una reducida diversidad de los cromosomas Y. Hay varias explicaciones para ello, la explicación más sencilla es la numérica: por cada cromosoma Y en una pareja de individuos, hay cuatro de cada autosoma y 3 cromosomas X. Esto reduce el tamaño de la población cromosómica, lo cual se ve reflejado en la reducida diversidad del cromosoma Y. Otra explicación, la cual tiene que ver con poblaciones humanas específicas, es la de los patrones de cruces: si un pequeño número de machos son más exitosos en reproducirse y dejan más descendencia, mientras otros lo hacen poco o nada, entonces el tamaño efectivo de la población y la diversidad de los cromosomas Y se ve reducida. Una explicación alternativa involucra la falta de recombinación del Y: si una mutación Y-específica se selecciona por dar ventaja selectiva, los portadores presentarán poca variación en sus cromosomas y las variantes al no poder recombinarse con otros cromosomas Y se irán perdiendo.

La mayoría de genetistas y muchos paleontólogos apoyan la hipótesis de "la salida de África" para el origen del *Homo sapiens* moderno, la cual se refiere a un ancestro común de origen africano y su posterior dispersión por todo el

mundo, con lo cual se predice que el ancestro paterno de todos los cromosomas Y modernos vivió en Africa. Por lo tanto, el estudio de los microsátélites del cromosoma Y puede llevar a la elaboración de árboles filogenéticos que muestren las relaciones modernas entre los cromosomas Y, y por tanto su origen. Así, con las medidas de las frecuencias de diferentes haplotipos de cromosomas se pueden diferenciar poblaciones. Poblaciones cercanamente relacionadas tendrán frecuencias similares de haplotipos, mientras las más distanciadas se espera muestren progresivamente mayores diferencias.

A la vez, las migraciones grandes pueden llevar al establecimiento de nuevas poblaciones con un mismo tipo de cromosomas Y, mientras el movimiento de pequeños grupos poblacionales que se mezclan con poblaciones existentes llevarán a la mezcla de los cromosomas Y, este evento puede ser reconocible por comparar las distribuciones de los haplogrupos de los cromosomas Y en combinación con el estudio de otros genes igual de informativos (ADNmt, polimorfismos autosómicos).

Así entonces, con la información que proveen los polimorfismos del cromosoma Y se pueden establecer líneas paternas y relaciones con un ancestro común, como también las frecuencias de los haplotipos en poblaciones específicas pueden ser usados para determinar relaciones genéticas entre grupos (Santos & Tyler-Smith 1996).

De esta forma, es que varios investigadores han informado resultados concluyentes. Por ejemplo, Bianchi *et al.* (1998), reportan que el haplotipo alfoide satelítico α h II esta asociado con el alelo A del microsatelite DYS19 y es específico para amerindios. Usando los datos obtenidos por Underhill *et al.* (1996) sobre cromosomas Y de grupos lingüísticos amerindios, ellos encontraron asociación del alelo DYS19A con la transición C-T en la posición 181 del locus DYS199. A su vez, Bianchi *et al.* (1997) muestran que hay desequilibrio de ligamiento de α h II, DYS199T y DYS19A, definiendo así con gran certeza la especificidad del cromosoma Y amerindio.

Ruíz-Narváez (1998), estudiando las tribus chibchas de Costa Rica y Panamá encontró una alta diversidad haplotípica para los microsatélites del cromosoma Y, lo cual no es diferente para otros grupos amerindios del continente, por lo que se ha llegado a concluir que los amerindios de Norte y Suramérica poseen el mismo haplotipo fundador del cromosoma Y (Pena *et al.* 1995, Santos *et al.* 1996a).

Así entonces, el análisis de la variación del cromosoma Y en asociación con otros estudios a nivel de ADNmt y autosómico, ayudará a conocer mejor la composición genética del país, su composición étnica y la influencia migratoria que ha sufrido.

Por lo tanto, tomando el hecho de que, históricamente se reconoce a los negros residentes en la zona Atlántica costarricense como de origen africano, con

variado grado de mezcla racial autóctona, es que se ha seleccionado un grupo de negroides de Limón para realizar el siguiente estudio genético basado en los polimorfismos del cromosoma Y, siendo este el primer estudio que se hace a este nivel con esta etnia, con el fin de conocer mejor la contribución que ha hecho este grupo al acervo genético de la población costarricense en general.

Objetivos específicos:

- Determinar las frecuencias de estos marcadores en la población
- Analizar la variación intrapoblacional respecto al resto de las etnias de la América central
- Analizar la variación interpoblacional respecto al resto de las etnias de la América central
- Comparar estos resultados con aquellos obtenidos en otros estudios de variación genética

Objetivo general:

- Estudiar los polimorfismos del cromosoma Y en un grupo negroide de Limón, Costa Rica.

Objetivos específicos:

- Determinar los haplotipos de siete locus específicos del cromosoma Y en esta población.
- Analizar la variación intrapoblacional mediante el cálculo de sus frecuencias y la diferenciación entre haplotipos.
- Analizar la variación interpoblacional mediante la comparación de sus frecuencias con otros grupos negroides reportados a nivel mundial.
- Comparar estas frecuencias con aquellas de otros grupos étnicos costarricenses reportados.

Materiales y métodos

1. Muestra poblacional

Limón, se encuentra en la costa Atlántica de Costa Rica, su población es predominantemente negra. Para este estudio, se seleccionó una muestra de 34 varones fenotípicamente negros, con ambos apellidos en inglés y no relacionados entre sí. Se les tomó 5 ml de sangre periférica con anticoagulante EDTA-2Na (1-2 mg/dl). La muestra fue tomada de pacientes ambulatorios que iban a exámenes de rutina al Laboratorio Clínico del Hospital Tony Facio de Limón, Costa Rica. Entre el 22 y el 27 de Abril de 1999.

2. Extracción del ADN

A dicha muestra se le extrajo el ADN por el método de precipitación con cloruro de sodio (Miller *et al.* 1988) como sigue: se trasvasan los 5 ml de sangre a un tubo cónico plástico de 50 ml y se le añaden 10 ml de buffer de lisis pH 7.4 (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, Na_2EDTA 0.1 mM) lavando y centrifugando la sangre hasta obtener un botón de leucocitos, los cuales se resuspenden en 5 ml de buffer SE pH 8.0 (NaCl 75 mM, Na_2EDTA 25 mM), con 25 μl de pronasa E (10 mg/ml) y 250 μl de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%. Luego se incubó toda la noche a 37 °C. Después de la digestión se les agrega 1.4 ml de NaCl 6 M y se centrifuga, se recoge el sobrenadante y se le añade un doble volumen de etanol

absoluto frío lo que produce la precipitación del ADN, este luego se recoge y resuspende en 200 µl de buffer TE pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

3. Marcadores genéticos

Como ya se mencionó, la mayor parte del cromosoma Y consiste de repeticiones en tándem. Hasta el 60% del cromosoma Y esta formado por secuencias largas en tándem, localizadas en el extremo Yq, estas son secuencias de hasta de 2.47 kb de la subfamilia satelítica Msp I llamada DYZ2, en donde se encuentran los marcadores DYS389, DYS390, DYS391 y el YAP. Otro grupo de secuencias cortas se hallan en el extremo Yp, en DYZ4 y DYZ5, aquí se ubican los marcadores DYS393 y DYS19 (Figura 1). La mayoría de estos polimorfismos pueden ser detectados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Roewer *et al.* 1992; Santos, Pena & Tyler-Smith 1995).

Se hizo la amplificación del material genético usando los siguientes siete marcadores, de los cuales seis son microsatélites polimórficos: el DYS19 tetranucleótido que presenta diez alelos, el DYS389a tetranucleótido con siete alelos, el DYS389b tetranucleótido con nueve alelos, el DYS390 tetranucleótido que presenta 10 alelos, el DYS391 tetranucleótido con seis alelos, el DYS393 tetranucleótido con seis alelos. El otro marcador es: el locus YAP (Y Alu Polimorphism) con dos alelos el YAP+ y el YAP- (Cuadro 1).

La elección de estos tetranucleótidos responde básicamente a razones prácticas, dada su abundancia y ubicación en el genoma, además que la asignación de alelos en repeticiones de cuatro nucleótidos muestra menos problemas que la de los microsatélites con repeticiones menores, y que hay suficientes referencias bibliográficas para estos marcadores en otras poblaciones.

Cuadro 1. Características principales de los microsatélites del cromosoma Y estudiados.

Locus	Motivo repetido	Número de alelos	Rango de repeticiones	Secuencia de los primers (5'-3')	Longitud producto PCR (pb)
DYS19	(CTAT/C) _n	10	10-19	CTACTGAGTTTCTGTTTATAGT ATGGCATGTAGTGAGGACA	174-210
DYS389a	(TCTG/TA) _n	7	7-13	CCAACTCTCATCTGTATTATCTAT GTCTTATCTCCACCCACCAGA	239-263
DYS389b	(TCTG/TA) _n	9	23-31	CCAACTCTCATCTGTATTATCTAT GTCTTATCTCCACCCACCAGA	353-385
DYS390	(CTG/AT) _n	10	18-27	TATATTTTACACATTTTGGGCC TGACAGTAAAATGAACACATTGC	191-227
DYS391	(CTAT) _n	6	8-13	CTATTCATTCAATCATAACACCCA GGATTCTTTGTGGTTGGGTCTG	275-295
DYS393	(GATA) _n	6	9-15	CCAACTCTCATCTGTATTATCTAT GTCTTATCTCCACCCACCAGA	108-132
YAP	+ → -Alu Inserción Alu			CAGGGGAAGATAAAGAAATA ACTGCTAAAAGGGGATGGAT	150 (-) 455 (+)

4. PCR

Todas las amplificaciones se hicieron en un termociclador Perkin Elmer 2400 y para las electroforesis se usó una cámara de secuenciación Cam Sec Hoefer SE-400.

Locus YAP, conocido como Elemento Polimórfico Alu del cromosoma Y. Presenta dos alelos el YAP+ con un tamaño de 455 pb y el YAP- con un tamaño de 150 pb, el tamaño depende de la presencia (YAP+) o ausencia (YAP-) de un elemento ALU (Hammer 1994). La amplificación por PCR se hizo de acuerdo a lo descrito por Hammer & Horai (1995) usando 10-20ng de ADN en un volumen de reacción final de 12.5 µl, con 1.25 mM de cada dinucleótido, 1.25 mM de cada iniciador y 1U de Taq polimerasa, con el siguiente perfil: 94 °C por 2 min. , luego 30 ciclos de 94 °C por 1 min., 51 °C por 1 min. y 72 °C por 1 min. La lectura de resultados se efectuó por electroforesis de agarosa Nusieve al 1% teñido el gel con bromuro de etidio.

Locus DYS19, presenta un polimorfismo de al menos 10 alelos de 174 a 210 pb en incrementos de 4 pb, debidos a la presencia de diferentes repeticiones en tándem del tetranucleótido CTAT/C (Arnemann *et al.* 1986).

Los **loci DYS389a y DYS389b** se amplificaron simultáneamente con un único par de iniciadores. El marcador DYS389a presenta siete alelos de 239 a

263 pb y el locus DYS389b tiene nueve alelos de 353 a 385 pb. Ambos en incrementos de 4 pb de la secuencia repetida TCTG/TA. Para determinar el tamaño del microsatélite DYS389a se le resta al amplificado del DYS389(a+b) el producto del DYS389b. La PCR, la electroforesis y la tinción se realizó igual que para los loci DYS19, DYS390, DYS391 y DYS393.

Locus DYS390, microsatélite que posee diez alelos, de 191 a 227 pb en incrementos de 4 pb, repitiéndose el tetranucleótido CTG/AT (Kayser *et al.* 1997, Knijff *et al.* 1997).

Locus DYS391, presenta un polimorfismo de seis alelos, de 275 a 295 pb en incrementos de 4 pb. La secuencia repetida es el tetranucleótido CTAT (Kayser *et al.* 1997, Knijff *et al.* 1997).

Locus DYS393, microsatélite que posee seis alelos, de 108 a 132 pb en incrementos de 4 pb. El motivo repetido es el tetranucleótido GATA (Kayser *et al.* 1997, Knijff *et al.* 1997).

Los anteriores cuatro loci (DYS19, DYS390, DYS391 y DYS393), se amplificaron usando de 10-20ng de ADN en un volumen de reacción final de 12.5 μ l, con 1.25 mM de cada dinucleótido, 1.25 mM de cada iniciador y 1U de Taq polimerasa, según el siguiente perfil: 94 °C por 3 min., seguido por 35 ciclos de 51 °C por 30 seg., 72 °C por 90 seg. y 94 °C por 30 seg., con un ciclo final de

extensión a 72 °C por 10 min. Los resultados se leyeron haciendo una electroforesis de poliacrilamida al 12%, corriendo el gel por 22 horas a 150 voltios y tiñendo luego con nitrato de plata.

Las lecturas para todos los marcadores usados se expresan de la siguiente forma: los microsatélites son identificados por el número de repeticiones, según las tablas de referencia Knijff *et al.* (1997) y Kayser *et al.* (1997), el marcador YAP se designa como la presencia (YAP+) o ausencia (YAP-) de un elemento ALU.

Los análisis de laboratorio se efectuaron en el Centro de Investigaciones en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA) y en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) ambos de la Universidad de Costa Rica.

5. Análisis estadístico

Se estimaron por métodos estadísticos convencionales usando el programa Statistica versión 4.5:

- Frecuencias alélicas y haplotípicas
- Diversidades génicas y haplotípicas
- Prueba exacta de diferenciación de las frecuencias alélicas

La variabilidad genética fue estudiada por medio del análisis de varianza molecular (AMOVA) de los haplotipos, usando el paquete estadístico poblacional Arlequin versión 1.1 (Shneider *et al.* 1997).

Resultados

La combinación de alelos Y-específicos observados para cada individuo usando seis microsatélites y el locus YAP, se pueden ver en el Cuadro 2. El Figura 2 presenta las frecuencias alélicas para cada uno de los sistemas polimórficos analizados. Para la estimación de estas frecuencias se usaron los 34 cromosomas Y para los cuales fue posible probar todos los marcadores.

Se encontraron 27 diferentes haplogrupos, dos fueron los más frecuentes: + -13-16-11-24-11-13 presente un $20.6\% \pm 7.0\%$ de los casos y el - -13-16-11-24-11-13 presente un $5.9\% \pm 4.1\%$ de los casos, para los marcadores YAP-DYS19-DYS389a-DYS389b-DYS390-DYS391-DYS393, respectivamente, con nueve individuos entre ambos haplogrupos (26.5%), diferenciándose únicamente por el YAP, los demás haplogrupos representan un 73.5% de los casos (Cuadro 5).

El microsatélite **DYS19** presentó cuatro alelos, de 13 a 16 repeticiones. El más frecuente fue el de 13 repeticiones en un $55.9\% \pm 8.6\%$ de los individuos (Cuadro 3). La diversidad haplotípica fue de 0.608 ± 0.064 , no siendo significativamente diferente de las de los demás microsatélites, a su vez el número promedio de diferencias fue de 0.88 ± 0.63 (Cuadro 6).

Cuadro 2. Alelos de los marcadores Y-específicos encontrados para un grupo afrocaribeño de Limón, Costa Rica

No. IND.	HAPLOTIPOS DEL CROMOSOMA Y						
	DYS19	DYS389a	DYS389b	DYS390	DYS391	DYS393	YAP
01NL	14	10	27	23	9	15	+
02NL	14	9	27	24	10	14	+
03NL	13	11	27	24	11	13	+
04NL	13	11	27	24	11	13	-
05NL	13	11	28	23	11	13	+
06NL	13	11	27	24	11	13	-
07NL	13	10	26	25	11	13	-
08NL	16	9	27	21	9	13	+
09NL	13	11	27	24	11	13	+
10NL	13	11	27	24	11	13	+
11NL	14	10	25	23	11	14	+
12NL	13	11	26	25	11	13	+
13NL	16	12	26	25	10	13	+
14NL	13	9	26	22	10	14	+
15NL	13	10	26	25	10	13	+
16NL	14	9	25	21	10	13	+
17NL	13	9	29	23	10	13	+
18NL	13	11	27	24	11	13	+
19NL	13	10	27	24	11	13	+
20NL	14	10	26	25	12	12	-
21NL	13	11	28	23	11	14	+
22NL	15	12	28	23	10	13	+
23NL	13	11	27	24	11	13	+
24NL	13	11	28	24	11	14	+
25NL	13	11	27	24	11	13	+
26NL	15	13	28	24	12	15	+
27NL	13	11	27	24	11	13	+
28NL	13	11	27	22	14	14	-
29NL	14	11	27	23	12	13	+
30NL	14	10	28	24	14	13	-
31NL	14	11	27	24	11	13	+
32NL	15	11	27	23	14	13	+
33NL	14	11	27	25	11	13	+
34NL	14	11	27	24	11	15	+

Cuadro 3. Frecuencias alélicas de los marcadores del cromosoma Y encontradas para un grupo afrocaribeño de Limón, Costa Rica.

MARCADOR ALELOS FRECUENCIAS (\pm D.E.)			MARCADOR ALELOS FRECUENCIAS (\pm D.E.)		
DYS19	13	0.559 \pm 0.086	DYS390	21	0.059 \pm 0.041
	14	0.294 \pm 0.079		22	0.059 \pm 0.041
	15	0.088 \pm 0.049		23	0.235 \pm 0.074
	16	0.059 \pm 0.041		24	0.471 \pm 0.087
				25	0.176 \pm 0.066
DYS389a	14	0.029 \pm 0.029	DYS391	9	0.059 \pm 0.041
	15	0.088 \pm 0.049		10	0.206 \pm 0.070
	16	0.588 \pm 0.086		11	0.559 \pm 0.086
	17	0.176 \pm 0.066		12	0.088 \pm 0.049
	18	0.088 \pm 0.049		14	0.088 \pm 0.049
20	0.029 \pm 0.029				
DYS389b	9	0.147 \pm 0.062		DYS393	12
	10	0.206 \pm 0.070	13		0.706 \pm 0.079
	11	0.559 \pm 0.086	14		0.176 \pm 0.066
	12	0.059 \pm 0.041	15		0.088 \pm 0.049
	13	0.029 \pm 0.029			
			YAP	+	0.794 \pm 0.070
				-	0.206 \pm 0.070

(Ninguno presenta diferencias significativas $p < 0.05$)

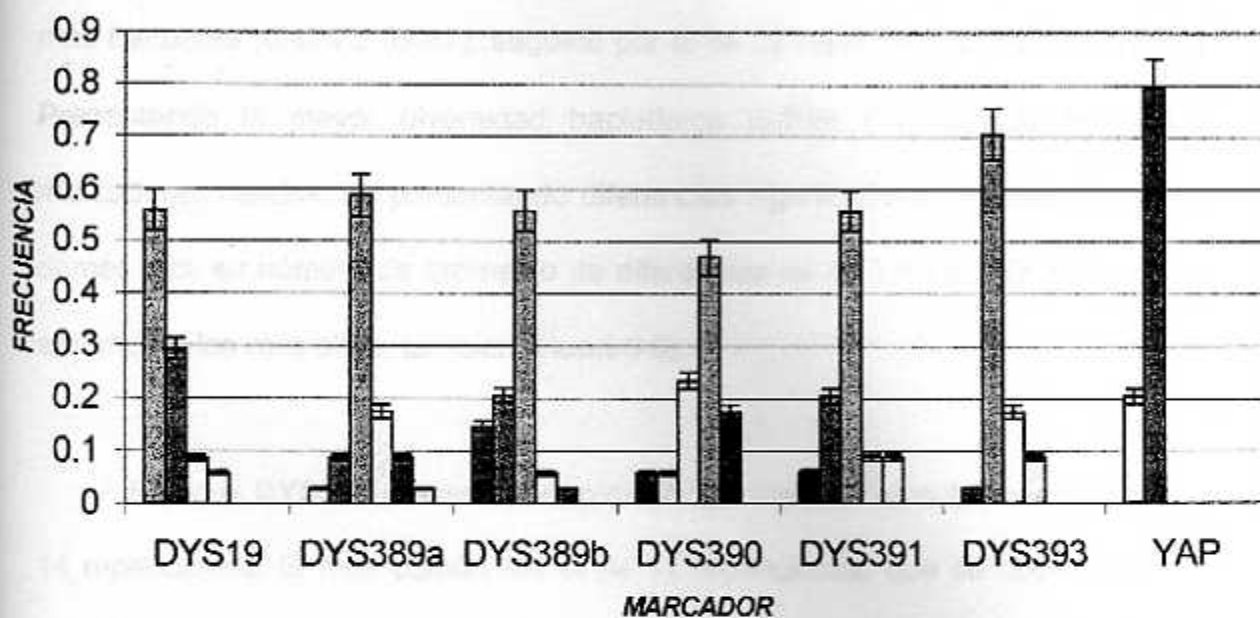


Figura 2. Frecuencias alélicas para los marcadores del cromosoma Y

El marcador **DYS389a** presentó seis alelos, de 14 hasta 20 repeticiones. Un $58.8\% \pm 8.6\%$ de los individuos presentaron el alelo de 16 repeticiones como el más frecuente. Mientras el marcador **DYS389b**, mostró cinco alelos que fueron de nueve a 13 repeticiones. El más frecuente fue el alelo de 11 repeticiones, presente un $55.9\% \pm 8.6\%$ de las veces (Cuadro 3). Ambos, **DYS389a** y **b**, presentaron diversidades haplotípicas similares de 0.624 ± 0.082 y 0.638 ± 0.072 , y sus número promedio de diferencia 1.03 ± 0.71 y 0.95 ± 0.67 , también son similares, no siendo diferentes estadísticamente entre sí (Cuadro 6).

Para el microsatélite **DYS390** se encontraron cinco alelos, de 21 a 25 repeticiones. Como se observa en el Figura 2 el alelo de 24 repeticiones fue el más frecuente (0.471 ± 0.087), seguido por el de 23 repeticiones (0.235 ± 0.074). Presentando la mayor diversidad haplotípica (0.706 ± 0.056) de todos los marcadores usados, no presentando diferencias significativas con respecto a los demás loci, su número de promedio de diferencias es de 1.10 ± 0.74 que resulta ser uno de los más altos también (Cuadro 6).

El locus **DYS391** presentó cinco diferentes alelos. Estos fueron de nueve a 14 repeticiones. El más común fue el de 11 repeticiones, que se observó en 19 individuos lo que representa un $55.9\% \pm 8.6\%$ de los casos (Figura 2). El valor de la diversidad haplotípica fue de 0.645 ± 0.075 y el número promedio de diferencias fue de 1.15 ± 0.76 (Cuadro 6).

El marcador **DYS393** mostró cuatro alelos, que variaron de 12 a 15 repeticiones. El más frecuente fue el de 13 repeticiones que se observó en el $70.6\% \pm 7.9\%$ de los casos (Figura 2). Este fue el que presentó la menor diversidad haplotípica (0.476 ± 0.091) de los microsatélites usados, su número promedio de diferencias es a su vez el más bajo, 0.63 ± 0.50 (Cuadro 6).

El marcador YAP generó ambos fragmentos, siendo el más frecuente el YAP+, presente en un $79.4\% \pm 7.0\%$ de los individuos y el YAP- en un $20.6\% \pm 7.0\%$ (Cuadro 3). La diversidad haplotípica resultó ser baja (0.337 ± 0.083) por el hecho de que sólo son dos alelos los que tiene (Cuadro 6).

La diversidad haplotípica total fue estimada en 0.961 ± 0.026 para los siete marcadores usados, con un valor promedio 0.576 ± 0.126 . La mayor diversidad la presentan los microsatélites DYS389a y b, DYS390 y DYS391 y menor diversidad los loci DYS19, DYS393 y el YAP (Cuadro 6). No hay diferencias significativas entre los valores ($p > 0.5$).

Cuadro 4. Alelos más frecuentes en varias poblaciones

LOCUS	ALELO	POBLACIÓN			
		LIMÓN (Este estudio)	ÁFRICA N.O. (Bosch et al. 1999)	CHIBCHAS Ruiz-Narvaéz 1998)	AMERINDIO (Bianchi et al. 1998)
DYS19	13	0.559	0.681	0.817	0.817
DYS389a	10	-----	-----	0.613	0.676
	11	0.588	0.581	-----	-----
DYS389b	27	0.559	0.596	0.559	0.320
DYS390	24	0.471	0.503	0.559	0.568
DYS391	9	-----	0.597	-----	-----
	10	-----	-----	0.753	0.857
	11	0.559	-----	-----	-----
DYS393	13	0.706	0.798	0.796	0.870

El Cuadro 7 muestra el resultado del análisis de varianza molecular total (AMOVA) comparando los afrocaribeños con los grupos amerindios chibchas de Costa Rica y Panamá (Ruíz-Narvaéz 1998) en los cuales se usaron los mismos microsatélites que en este estudio, se comparan las frecuencias haplotípicas encontradas. La varianza para el análisis entre grupos fue de 16.58% y la varianza intrapoblacional fue de 83.42%. A su vez, se obtuvo un valor de diferencias al cuadrado R_{st} de 0.166, lo que indica que sí hay variación entre ambos grupos étnicos.

Al comparar por AMOVA las frecuencias alélicas de los mismos microsatélites usados en este estudio, y los obtenidos por Bosch *et al.* (1999) en varias poblaciones del nor-oeste de África (Cuadro 8) se obtiene que los valores de R_{st} para los locus DYS19, DYS389a, DYS389b, DYS390 y YAP no fueron significativamente diferentes de cero ($p > 0.05$, análisis de permutación), por lo que la mayor varianza genética (hasta 100%) se da dentro de las poblaciones. Sin embargo, los microsatélites DYS391 y DYS393 presentaron diferencias estadísticamente significativas en estos dos marcadores, 0.586 y 0.213, respectivamente ($p < 0.001$, análisis de permutación).

Cuadro 5. Frecuencias haplotípicas del cromosoma Y encontradas Para un grupo afrocaribeño de Limón, Costa Rica.

HAPLOTIPOS								
HAPLOGRUPO	YAP	DYS19	DYS389a	DYS389b	DYS390	DYS391	DYS393	FRECUENCIA
Y1	+	13	17	9	22	10	14	0.029 ±0.029
Y2	+	13	20	9	23	10	13	0.029 ±0.029
Y3	+	13	16	10	25	10	13	0.029 ±0.029
Y4	-	13	16	10	25	11	13	0.029 ±0.029
Y5	+	13	17	10	24	11	13	0.029 ±0.029
Y6	+	13	15	11	25	11	13	0.029 ±0.029
Y7	-	13	16	11	22	14	14	0.029 ±0.029
Y8	+	13	16	11	24	11	13	0.206 ±0.070
Y9	-	13	16	11	24	11	13	0.059 ±0.041
Y10	+	13	17	11	23	11	13	0.029 ±0.029
Y11	+	13	17	11	23	11	14	0.029 ±0.029
Y12	+	13	17	11	24	11	14	0.029 ±0.029
Y13	+	14	16	9	21	10	13	0.029 ±0.029
Y14	+	14	18	9	24	10	14	0.029 ±0.029
Y15	+	14	15	10	23	11	14	0.029 ±0.029
Y16	-	14	16	10	25	12	12	0.029 ±0.029
Y17	+	14	17	10	23	9	15	0.029 ±0.029
Y18	-	14	18	10	24	14	13	0.029 ±0.029
Y19	+	14	16	11	23	12	13	0.029 ±0.029
Y20	-	14	16	11	24	11	13	0.029 ±0.029
Y21	+	14	16	11	24	11	15	0.029 ±0.029
Y22	+	14	16	11	25	11	13	0.029 ±0.029

...continuación Cuadro 5

Y23	+	15	16	11	23	14	13	0.029 ± 0.029
Y24	+	15	16	12	23	10	13	0.029 ± 0.029
Y25	+	15	15	13	24	12	15	0.029 ± 0.029
Y26	+	16	18	9	21	13	13	0.029 ± 0.029
Y27	+	16	14	12	25	13	13	0.029 ± 0.029

Cuadro 6. Diversidad haplotípica y número promedio de diferencias de los haplotipos del cromosoma Y, para cada marcador en un grupo afrocaribeño de Limón, Costa Rica.

MARCADOR	No. ALELOS ENCONTRADOS	DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA	NÚMERO PROMEDIO DE DIFERENCIAS ¹
DYS19	4	0.608 ± 0.064	0.88 ± 0.63
DYS389a	6	0.624 ± 0.082	1.03 ± 0.71
DYS389b	5	0.638 ± 0.072	0.95 ± 0.67
DYS390	5	0.706 ± 0.056	1.10 ± 0.74
DYS391	5	0.645 ± 0.075	1.15 ± 0.76
DYS393	4	0.476 ± 0.091	0.63 ± 0.50
YAP	2	0.337 ± 0.083
PROMEDIO	0.576 ± 0.126	0.96 ± 0.67
TOTAL	0.961 ± 0.026	5.74 ± 2.82

¹ Número promedio de loci diferentes por haplotipo.

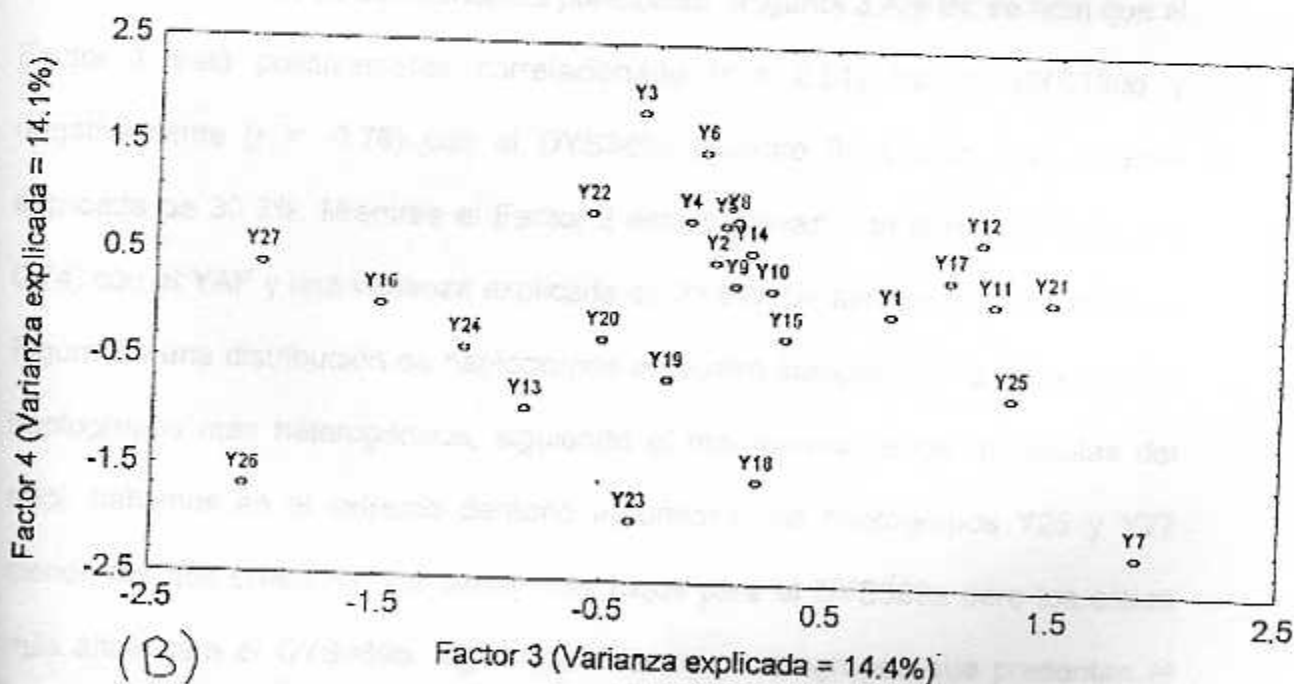
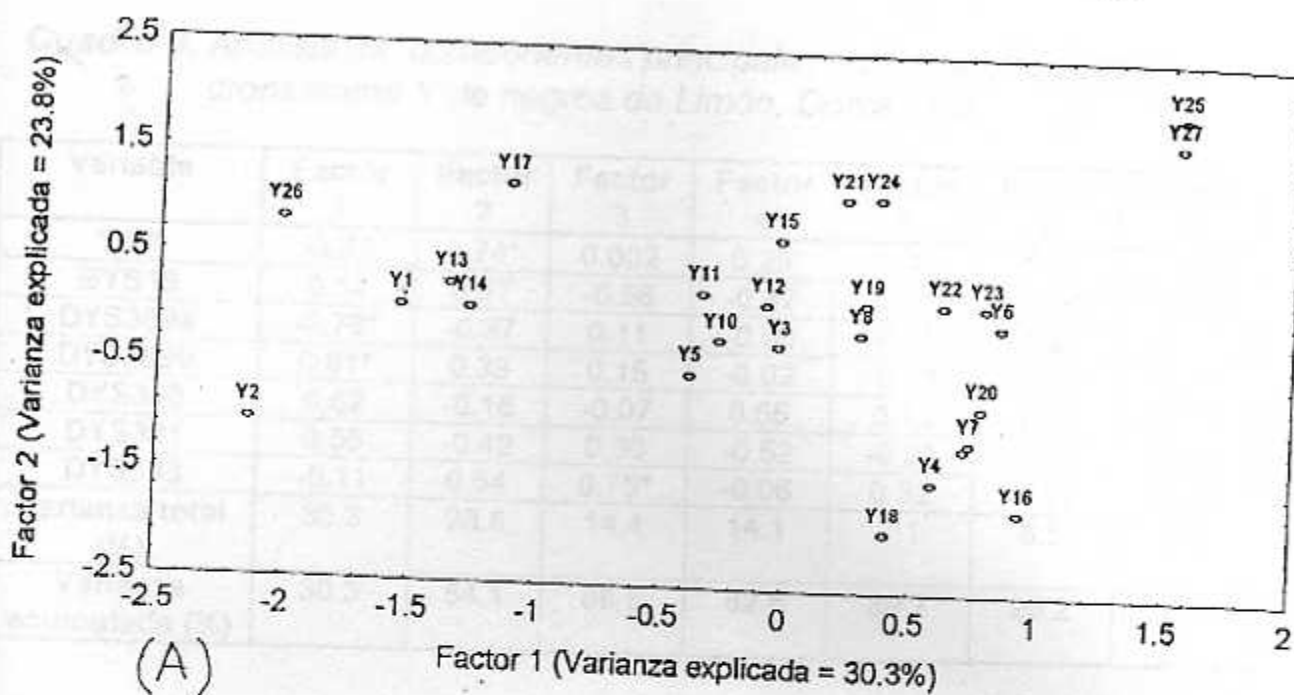


Figura 3 (A y B). Análisis de componentes principales de los haplotipos del cromosoma Y de negroides de Limón, Costa Rica.

Cuadro 9. Análisis de componentes principales de los haplotipos del cromosoma Y de negros de Limón, Costa Rica.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7
YAP	-0.37	0.74*	0.002	0.25	-0.47	-0.11	-0.13
DYS19	0.14	0.57	-0.56	-0.47	0.21	-0.26	-0.08
DYS389a	-0.76*	-0.37	0.11	-0.08	-0.03	-0.47	0.18
DYS389b	0.81*	0.39	0.15	-0.02	-0.15	-0.09	0.37
DYS390	0.62	-0.18	-0.07	0.65	0.13	-0.33	-0.14
DYS391	0.56	-0.42	0.30	-0.52	-0.29	-0.16	-0.21
DYS393	-0.11	0.54	0.75*	-0.06	0.32	-0.07	-0.09
Varianza total (%)	30.3	23.8	14.4	14.1	7.1	6.5	3.8
Varianza acumulada (%)	30.3	54.1	68.5	82.6	89.7	96.2	100

En el análisis de componentes principales (Figuras 3 A y B), se nota que el Factor 1 está positivamente correlacionado ($r = 0.81$) con el *DYS389b* y negativamente ($r = -0.76$) con el *DYS389a* (Cuadro 9). Dando una varianza explicada de 30.3%. Mientras el Factor 2 está positivamente correlacionado ($r = 0.74$) con el YAP y una varianza explicada de 23.8%. Se aprecia claramente en la Figura 3A una distribución de haplogrupos en cuatro agrupamientos, al centro los haplogrupos más heterogéneos, siguiendo el movimiento de las manecillas del reloj, hallamos en el extremo derecho agrupados, los haplogrupos Y25 y Y27 siendo los que presentan los alelos más bajos para el *DYS389a* pero los alelos más altos para el *DYS389b*; siguiendo están los haplogrupos que presentan el YAP- como un sólo grupo y en el extremo izquierdo están los haplogrupos que presentaron los alelos más altos para el *DYS389a* (≥ 16 repeticiones) y los más bajos para el *DYS389b*.

Discusión

En la Figura 3B se nota que el Factor 3 está positivamente correlacionado ($r = 0.75$) con el DYS393 (Cuadro 9), con una varianza explicada de 14.4 y el Factor 4 muestra una varianza explicada de 14.1%, por lo que se aprecia una distribución de haplogrupos en dos grupos, los del lado derecho que tienen los alelos más altos para el DYS393 y en el lado izquierdo los que tienen los alelos más bajos.

Discusión

El presente estudio tiene información detallada en cuanto a la variabilidad, de seis microsátélites tetranucleotídicos y el locus YAP, marcadores genéticos específicos del cromosoma Y, usados en un grupo de afrocaribeños de Limón, Costa Rica.

Se obtuvieron 27 haplogrupos diferentes en una muestra de 34 cromosomas Y de negroides, usando siete marcadores, esto muestra que la información poblacional proporcionada por estos marcadores contribuye con su validación para análisis forenses y demuestra su informatividad para estudios de genética de poblaciones (Cuadro 4). Esta diversidad génica es consistente con otros estudios, en donde se ha mostrado una mayor diversidad en poblaciones africanas que en no africanas (Stoneking *et al.* 1997, Deka *et al.* 1996), lo que apoya la hipótesis del poblamiento del mundo por irradiación a partir de ancestros africanos. Sin embargo, la diversidad genética esta relacionada, principalmente, con eventos demográficos en la historia de las poblaciones, más que con edad de la población, como también por una alta tasa de mutación y el tamaño efectivo de la población. De allí, que la variabilidad encontrada en este grupo negroide parece indicar a individuos provenientes de distintas regiones del África, lo que esta en conformidad con la historia de la colonización de América, aunque no se puede determinar con los datos obtenidos la contribución de los demás factores, como tamaño poblacional y haplotipos fundadores.

Sin embargo, se puede ver, por haberse obtenido dos haplogrupos como los más frecuentes (Y8=29.6%, Y9=5.9%) que la variación genética del cromosoma Y esta fuertemente estructurada por haplogrupos fundadores.

Los microsatélites analizados, en general, presentaron de cuatro a seis alelos, con una frecuencia mayor alrededor de dos alelos en particular (Figura 2), en promedio las frecuencias más altas rondaron el 50%, sin embargo, el microsatélite DYS393 y el elemento YAP+ presentaron frecuencias superiores al 70% para uno de sus alelos, lo que muestra para esta población, que estas regiones presentan baja diversidad nucleotídica (Hammer 1995).

Los cromosomas YAP+, que contienen la inserción Alu, son encontrados en frecuencias altas en poblaciones africanas y en frecuencias bajas, pero detectables, en poblaciones europeas y asiáticas. Así, se encuentra que la frecuencia de los cromosomas YAP+ en poblaciones japonesas es de un 42%, de un 68-78% en poblaciones africanas sub-Saharianas y de un 0-11% en poblaciones caucásicas (Hammer 1994; Hammer & Horai 1995; Spurdle *et al.* 1994; Bianchi *et al.* 1997). Por lo que, la inserción del elemento Alu que da origen al YAP+ es considerado como indicador de ancestría africana, la cual ha ocurrido solamente una vez en humanos modernos del África (Hammer 1994). Como sería de esperar para este estudio, al estar trabajando con una población de reconocida ancestría africana, se obtuvo una frecuencia alta (79.4%) para el fragmento YAP+ y de 20.6% para el YAP-. Igualmente, Bosch *et al.* (1999) informan para las

poblaciones del nor-oeste de África frecuencias de 80.4% y 18.6% para el YAP+ y el YAP-, respectivamente, las cuales son muy parecidas a las reportadas en este estudio.

Los microsatélites también pueden ser usados para comparar poblaciones. Poblaciones con diferentes distribuciones de microsatélites son distintas. Sin embargo, poblaciones con distribuciones de microsatélites similares no necesariamente son similares. Esto es así porque, la evolución convergente puede llevar a diferentes cromosomas Y portando la misma distribución de alelos microsatélites. (Hammer 1995). Deka *et al.* (1996) muestran que el alelo más frecuente en 14 de 15 poblaciones, étnica y geográficamente distintas, estudiadas para cinco microsatélites Y-específicos, es el 283 pb (11 repeticiones) del locus DYS391, lo que resulta consistente con este estudio, donde se obtuvo una frecuencia de un 55.9% para el mismo alelo. Para el DYS390, dos poblaciones africanas (Benin y Sokoto) presentaron el alelo de 203 pb (24 repeticiones) como el más frecuente, el cual es raro en poblaciones no africanas, así para un estudio del nor-oeste de África (Bosch *et al.* 1999) informan para este microsatélite una frecuencia de 50.3% para el alelo de 24 repeticiones. En el caso del presente estudio, el DYS390, presentó el alelo de 24 repeticiones en un 47.1% de los individuos. Dos mecanismos pueden ser los responsables para la observación de alelos frecuentes en diferentes poblaciones: ancestría común y/o migraciones entre poblaciones, lo cual esta en concordancia con los datos reportados por los

autores ya mencionados, y que demuestra la historia de migraciones negroides hacia nuestro país.

La diversidad haplotípica total, para los siete marcadores Y-específicos usados fue de 0.961, que no es muy diferente al 0.937 obtenido por Ruíz-Narváez (1998) para cinco tribus amerindias de Costa Rica y Panamá o al 0.990 obtenido para mayas y muskokes de norteamérica, o al 0.930 estimado para poblaciones del nor-oeste de África por Bosch *et al.* (1999) con los mismos microsatélites que en este trabajo. De acuerdo a Santos *et al.* (1996a, 1996c), la alta diversidad haplotípica observada en grupos indígenas norteamericanos, se debe a la introducción de haplotipos de origen negro y caucásico en los muskokes, igualmente se puede concluir para las poblaciones negras que se han establecido en otras latitudes, en donde se han ido mezclando con las poblaciones ya establecidas, producto del sometimiento y la asimilación de las nuevas culturas, como es en este caso.

Esto contrasta con resultados previos de ADNmt, según los cuales las tribus chibchas de Costa Rica y Panamá, presentan una diversidad haplotípica reducida del ADNmt al compararlos con otros grupos no chibchas y la razón para ello es la misma, la introducción de genes foráneos vía varones dentro de las tribus (Santos 1992, Batista *et al.* 1995). Así entonces, la historia de los cromosomas Y humanos puede ser diferente de la de los ADNmt, por lo que podría reflejar aspectos de la historia poblacional, como prácticas culturales, que

gobernaban la estructura de cruces y las diferencias de comportamiento de machos y hembras en migraciones, guerras y colonizaciones.

Por la rápida tasa de evolución, el modo de herencia maternal y no presentar recombinación, es que el ADNmt ha sido usado en estudios poblacionales y ha provisto mucha información sobre evolución humana (Bortolini *et al.* 1997). Los diferentes estudios han mostrado un mayor grado de diferenciación en el ADNmt africano que en el de otros grupos humanos, lo que apoya la hipótesis de un origen africano, y que es consistente con lo informado por Cavalli-Sforza (1998) sobre la mayor diversidad genética entre poblaciones africanas, al compararlas por ADNmt y ADNn, contra las no africanas, esta alta diversidad también ha sido observada en poblaciones afrobrasileñas (Bortolini *et al.* 1997). Así es como una vez más, al igual que con el cromosoma Y, se va consolidando la hipótesis del poblamiento humano a partir de ancestros africanos.

Como ya se ha mencionado, por sus características singulares es que el cromosoma Y es importante para el estudio de genética de poblaciones, principalmente por que es transmitido de padres a hijos sin cambios, excepto por la acumulación gradual de mutaciones (tasa de mutación 5×10^{-7}), lo que permite la reconstrucción de linajes paternos por comparación de polimorfismos y la elaboración de árboles filogenéticos (Scozzari *et al.* 1997). Mediante el análisis por componentes principales que se hizo a partir de las frecuencias haplotípicas halladas en este grupo afrocaribeño, se ve claramente que el factor 2 está correlacionado positivamente con el YAP y que por lo tanto logra separar los

haplotipos en YAP+ y YAP-. De acuerdo al trabajo de Santos *et al.* (1999) hubo un haplotipo fundador localizado en África que era YAP- que irradió al resto del mundo y que por un evento mutacional, en donde hubo una inserción Alu, la cual ha ocurrido solo una vez en humanos modernos, es que se obtuvo el YAP+ el cual es específico de grupos africanos (Hammer 1994). En el estudio de Santos *et al.* (1999), antes mencionado se estudiaron 11 poblaciones a nivel mundial y solo las de reconocida ancestría africana mostraron el YAP+, por lo que era de esperar en este trabajo, que al hacer un estudio por componentes principales, los haplotipos que no presentaran la inserción Alu (YAP-) se agruparan en un solo bloque como efectivamente ocurrió. Entonces, el análisis de componentes principales muestra que los marcadores que más influyen en la diferenciación intrapoblacional de los haplotipos son el DYS389a, DYS389b, YAP y DYS393 que dan una varianza explicada de 30.3%, 23.8%, 14.4% y 14.1%, respectivamente.

De 41 negros uruguayos analizados, por Bravi *et al.* (1997), encontraron que un 49% tenían linajes maternos de ancestría africana, 32% eran de ancestría amerindia, 12% eran de ancestría caucásica y en un 7% no se pudo determinar la ancestría. Por origen del cromosoma Y se estableció un 18% de ancestría africana y un 23% de ancestría caucásica. Por ello concluyeron que, debido a una mayor presencia de linajes maternos amerindios y menor de linajes paternos amerindios, las comunidades negras estaban constituidas, más frecuentemente, por parejas de varones negros con mujeres amerindias que entre varones amerindios y mujeres negras. E igualmente que eran más

frecuentes los cruces entre varones caucásicos y mujeres negras que a la inversa. Conclusión que, de acuerdo a los datos obtenidos en este estudio, no es posible comprobar totalmente, sin embargo, es de esperar el mismo comportamiento en el establecimiento y cruce de los grupos caucasoides, amerindios y negroides que llegaron a formar lo que hoy día somos en cuanto a mezcla racial.

El AMOVA realizado para comparar los negroides con grupos amerindios de Costa Rica y Panamá, mostró que más del 80% de la varianza genética se encuentra dentro de los grupos, lo que permite identificar linajes específicos del cromosoma Y para diferentes grupos poblacionales, ya que se obtuvo un R_{st} de 0.166 ($p > 0.05$, análisis de permutación), lo que indica casi un 17% de diferenciación entre las poblaciones negras e indígenas.

Ahora, al comparar por AMOVA las frecuencias alélicas de los mismos microsatélites usados en este estudio, y obtenidos por Bosch *et al.* (1999) en varias poblaciones del nor-oeste de África se obtiene que los valores de R_{st} para los locus DYS19, DYS389a, DYS389b y DYS390 no son estadísticamente diferentes de cero y que la mayor varianza genética (hasta 100%) se da dentro de las poblaciones. Sin embargo, los microsatélites DYS391 y DYS393 sí presentaron valores de R_{st} mayores que cero (0.586 y 0.213, respectivamente), y que mostraron diferencias estadísticamente significativas en estos dos marcadores ($p < 0.001$, análisis de permutación). La razón para ello puede ser que, si todos los loci son Y-específicos y no hay recombinación, se debe tomar

como que todos los marcadores usados son ligados, por lo que al obtener que solo el DYS391 y el DYS393 presentaron diferencias significativas se puede deber al tamaño muestral, al efecto de haplotipos fundadores presentes en ambas poblaciones, a la deriva genética o a la tasa de mutación específica para cada locus, no estimadas en este estudio, pero que si fueron calculadas por Ruiz-Narvaéz (1998), para grupos amerindios, él obtuvo una tasa de mutación para el DYS391 de 7.53×10^{-5} y para el DYS393 de 1.78×10^{-4} , que es mucho menor que la tasa de mutación empírica calculada por Bianchi *et al.* (1998) de 1.2×10^{-3} para microsatélites del cromosoma Y, lo que muestra que en la variación encontrada la tasa de mutación es menos importante que la deriva genética en la diferenciación de grupos humanos. A la vez, la naturaleza convergente de las mutaciones en microsatélites puede oscurecer las verdaderas relaciones filogenéticas de los haplotipos, en poblaciones de origen ancestral. Por lo que, dos haplotipos pueden ser iguales por estado y no por descendencia, o sea, dos idénticos haplotipos pueden no derivar de un haplotipo ancestral común y un haplotipo puede mutar a otro por múltiples vías (Hammer 1995).

En resumen, este grupo negroide presenta una alta diversidad haplotípica, corroborando la idea que se trata de una etnia con larga historia ancestral, que es de reciente establecimiento en Costa Rica y que posee una historia de sustracción de individuos de sus tierras natales con su posterior mezcla con las etnias propias de las nuevas regiones.

Para completar el estudio de la variación del cromosoma Y en poblaciones negroides de Costa Rica, se recomienda ampliar este análisis a las poblaciones guanacastecas con evidente ancestría africana, pues como se mencionó en la introducción, la historia poblacional del país y los estudios en hemoglobinas anormales muestran un importante componente negroide en la zona de Guanacaste (Saénz, Chaves y Quintana 1986). Esto es consistente con la historia de Costa Rica, que registra dos oleadas migratorias de negros, la primera por parte de los esclavos negros que los españoles comercializaban y que se llegaron a establecer en nuestro país, propiamente Guanacaste, y la segunda oleada con la construcción del ferrocarril y el desarrollo de la actividad bananera en Limón. Por lo tanto, ya está estudiado a nivel de la variación del cromosoma Y este grupo limonense, faltaría hacer lo mismo con los de Guanacaste.

Conclusiones

Esta investigación ha mostrado que la variación humana para el cromosoma Y es una invaluable herramienta para el estudio de poblaciones, desde el punto de vista genético y antropológico ya que provee información sobre la composición génica de los individuos, sobre la composición étnica del país y la influencia migratoria que ha sufrido.

Como se sabe, una mutación es específica de ciertas poblaciones, solamente, cuando el alelo mutante está ausente o en muy baja frecuencia en otras poblaciones, en este estudio no se encontró alelos únicos, ni variantes privadas, para los negroides de Limón.

Los loci macho-específicos del cromosoma Y aquí analizados, al ser transmitidos paternalmente, no se recombinan y están sujetos solo a tasas de mutaciones macho-específicas; por lo que pueden ser especialmente usados para la identificación de linajes masculinos, para estudios poblacionales, de paternidad y forenses.

La discrepancia en los patrones de variación genética entre los genomas mitocondriales y del cromosoma Y se pueden deber a tamaño de muestra, población en estudio, métodos y marcadores usados para diferenciar la variación. Esto hace que una estricta comparación resulte problemática. Por lo tanto, para diferenciar los patrones de mezcla de los genomas transmitidos paternal y

maternalmente, el estudio debe ser llevado a cabo en las mismas poblaciones e, idealmente, con los mismos individuos, restringiendo el análisis a regiones genómicas bien definidas, para contrarrestar así la heterogeneidad de las migraciones de las poblaciones ya sea pasadas o presentes, voluntarias u obligadas.

Para dejar bien caracterizada a la población negroide de Costa Rica es necesario estudiar la población guanacasteca, pues la historia menciona la influencia de dos oleadas migratorias de negros a nuestro país, y que se establecieron en épocas distintas, una en Guanacaste y la otra en Limón.

Bibliografía

- Arnemann J., Jakubiczka S., Schmidtke J., Schafer R. & Epplen J.T. 1986. Clustered GATA repeats (Bkm sequences) on the human Y chromosome. *Hum. Genet.* 73: 301-303.
- Batista O., Kolman C.J. y Bermingham E. 1995. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panama. *Hum. Mol. Genet.* 4:921-929.
- Bianchi O., Catanesi C., Bailliet G., Martinez-Marignac V., Bravi C., Vidal-Rioja L., Herrera R. & López-Camelo J. 1998. Characterization of ancestral and derived Y-chromosome haplotypes of New World native populations. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1862-1871.
- Bianchi O., Bailliet G., Bravi C., Carnese F., Rothhammer F., Martínez-Marignac V., & Pena S. 1997. Origin of Amerindian Y-chromosome as inferred by the analysis of six polymorphic markers. *Am. J. Phys. Anthropol.* 102:79-89.
- Bortolini M.C., Zago M., Salzano F., Silva-Júnior W., Bonatto S., Da Silva M.C. & Weimer T. 1997. Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African Brazilian population. *Hum. Biol.* 69:141-159.
- Bosch E., Calafell F., Santos F., Pérez-Lezaun A., Comas D., Benchemsi N., Tyler-Smith C. & Bertranpetit J. 1999. Variation in Short Tandem Repeats is deeply structured by genetic background on the human Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 65:1623-1638.
- Bravi C., Sans M., Bailliet G., Martínez-Marignac V., Portas M., Barreto I., Bonilla C. & Bianchi O. 1997. Characterization of mitochondrial DNA and Y-chromosome haplotypes in a Uruguayan population of African ancestry. *Hum. Biol.* 69:641-652.
- Carvalho-Silva D.R., Santos F.R., Hutz M.H., Salzano F.M. & Pena S.D. 1999. Divergent Human Y-chromosome microsatellite evolution rates. *J. Mol. Evol.* 49: 204-214.
- Cavalli-Sforza L.L. 1998. The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet.* 14: 60-65.
- Deka R., Jin L., Shriver M., Mei Yu L., Saha N., Barrantes R., Chakraborty R. & Ferrell R. 1996. Dispersion of human Y chromosome haplotypes based on five microsatellites in global populations. *Genome Research.* 6:1177-1184.

- Giles R.E., Blanc H., Cann H.M. & Wallace D.C. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6715-6719.
- Hammer M.F. 1994. A recent insertion of an Alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies. *Mol. Biol. Evol.* 11: 749-761.
- Hammer M.F. 1995. A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature*. 378:376-378.
- Hammer M.F. & Horai S. 1995. Y chromosomal DNA variation and the peopling of Japan. *Am. J. Hum. Genet.* 56:951-962.
- Jobling M. & Tyler-Smith Ch. 1995. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *TIG* 11(11):449-456.
- Jobling A., Pandya A. & Tyler-Smith. 1997. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.* 110:118-124.
- Kayser M., Caglia A., Corach D., Fretwell N., Gehrig C., Graziosi G., Heidorn F., Herrmann S. 1997. Evaluation of Y chromosome STRs: a multicenter study. *Int. J. Legal Med.* 110: 125-133.
- Knijff P., Kayser M., Caglia A. 1997. Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int. J. Legal Med.* 110: 134-140.
- Lahn B.T. & Page D.C. 1997. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675-680.
- Madrigal L. 1989. Hemoglobin genotype, fertility, and the Malaria Hypothesis. *Hum. Biol.* 61: 311-325.
- Meléndez C. y Duncan Q. 1972. *El negro en Costa Rica*. 10 ed. Editorial Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 258 p.
- Meléndez C. 1981. *Historia de Costa Rica*. 3ra. Ed. Editorial UNED. San Jose, Costa Rica. pp:39-48, 60-79.
- Miller S.A., Dykes D.D. & Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 215.
- Morera-Brenes B. 1995. Caracterización étnica de la población costarricense mediante marcadores genéticos. M.Sc. Tesis, Universidad de Costa Rica.
- Nachman M. 1998. Y chromosome variation of mice and men. *Mol. Biol. Evol.* 15:1744-1750.

- Pérez-Lezaun A., Calafell F., Comas D., Mateu E., Bosch E., Martínez-Arias R., Clarimón J., Fiori G. & Bertranpetit J. 1999. Sex migration patterns in Central Asian populations, revealed by analysis of Y-chromosome short tandem repeats and mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* 65:208-219.
- Rodríguez E. 1980. *Biografía de Costa Rica*. 1ª. Ed. Editorial Costa Rica. San Jose, Costa Rica. pp: 13-21.
- Roewer L., Amemann J., Spurr N.K., Grzeschik K.H. & Epplen J.T. 1992. Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum. Genet.* 89:389-394.
- Ruiz-Narvaéz E. 1998. *Variación genética del cromosoma Y en las poblaciones amerindias de Costa Rica y Panamá*. M.Sc. Tesis, Universidad de Costa Rica.
- Saénz G., Chaves M. & Quintana E.M. 1986. Las hemoglobinopatías en Costa Rica. Aspectos históricos, culturales y epidemiológicos. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 7: 95-106.
- Santos M. 1992. *Análisis de variación genética del ADNmt y nuclear de una población Amerindia, Huetar, Costa Rica*. M.Sc.Tesis, Universidad de Costa Rica.
- Santos F.R., Pena S.D. & Tyler-Smith. 1995. PCR haplotypes for the human Y chromosome based on alphoid satellite DNA variants and heteroduplex analysis. *Gene* 165: 191-198.
- Santos F.R., Rodríguez-Delfín L., Pena S.D., Moore J. & Weiss K.M. 1996(a). North and South Amerindians may have the same major founder Y chromosome haplotype. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 1369-1370.
- Santos F.R., Bianchi N.O. & Pena S.D. 1996 (b). Worldwide distribution of human Y chromosome haplotypes. *Genome Research* 6: 601-611.
- Santos F.R., Gerelsaikan T., Munkhtuja B., Oyunsuren T., Epplen J T. & Pena S.D.J. 1996(c). Geographic differences in the allele frequencies of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19. *Hum. Genet.* 97:309-313.
- Santos F. R. & Tyler-Smith Ch. 1996. Reading the human Y chromosome: the emerging DNA markers and human genetic history. *Brazilian Journal of Genetics.* 19(4):665-670.

- Santos F.R. 1997. The Y alphoid heteroduplex (ah) polymorphic system. Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
- Santos F.R., Pandya A., Tyler Smith Ch., Pena S., Schanfield M., Leonard W., Osipova L. Crawford M. & Mitchell J. 1999. The Central Siberian Origin for native American Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 64:619-628.
- Scozzari R., Cruciani F., Malaspina P., Santolamazza P., Ciminelli B., Torroni A. Modiano D., Wallace D. 1997. Differential structuring of human populations for homologous X and Y microsatellite loci. *Am. J. Hum. Genet.* 61:719-733.
- Shimmin L.C., Chang B.H. & Li W.H. 1993. Male-driven evolution of DNA sequences. *Nature* 362:745-747.
- Shneider S., Kueffer J.M., Roesli D. & Excoffier L. 1997. Arlequin version 1.1. A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Spurdle A.B., Hammer M.F. & Jenkins T. 1994. The Alu polymorphism in southern Africans populations and its relationship to other Y-specific polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 54:319-330.
- Stephan W., Xing L., Kirby A. & Braverman M. 1998. A test of the background selection hypothesis based on nucleotide data from *Drosophila ananassae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:5649-5654.
- Stoneking M., Fontius J.J., Clifford S.L., Soodyall H., Arcot S.S. 1997. Alu insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a large population size in Africa. *Genome Res.* 7: 1061-1071.
- Underhill P.A., Jin L., Zemans R. Oefner P.J. & 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.
- Wiehe T.H. & Stephan W. 1993. Analysis of a genetic hitchhiking model, and its Application to DNA polymorphism data from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 10:842-855.