



**Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología. Cátedra de
Virología. Doctorado en Ciencias de la Salud.**

Doctoranda
Lic. Daiana Jimena Sanabria

**Estudio de la Infección con virus JC y HPV en
Misiones : análisis Étnico-Geográfico según
marcadores moleculares uniparentales (ADNmt)
y heterogeneidad viral**

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de
“Doctor en Ciencias de la Salud”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Director
Dr. Rodolfo H. Campos
Co-Directora
Dra. Inés Badano

Buenos Aires, 2018



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-
CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Tesis para optar por el título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Estudio de la Infección con virus JC y HPV en Misiones: Análisis Étnico-
Geográfico según marcadores moleculares uniparentales (ADNmt) y
heterogeneidad viral

Lic. Daiana Jimena Sanabria
Año 2018

Dirección de Tesis: Dr. Rodolfo H. Campos

Dirección Adjunta de Tesis: Dra. Inés Badano

Subárea de Investigación: Ciencias de la Salud

Lugar de realización: Laboratorio de Biología Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

.....
Lic. Daiana J. Sanabria
Tesisista

.....
Dr. Rodolfo H. Campos
Director

.....
Dra. Ines Badano
Directora Adjunta

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires, por permitirme continuar mi formación académica.

A la Universidad Nacional de Misiones, por brindarme mi título de grado, y aún hoy el espacio como estudiante de posgrado y docente de dicha casa de estudios.

A la Educación Pública, Gratuita y de Calidad que se brinda en nuestro país y a la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por financiar mi formación y la de muchos científicos más.

Al Dr. Rodolfo Campos y al Dr. Javier Liotta, por guiarme en este proceso y brindarme su tiempo y dedicación.

A la Dra. Ines Badano, por iniciar mi vocación científica, por acompañarme desde el inicio en este camino "paso a paso" que fue la formación doctoral, por estar en los días coloridos y por no alejarse en los días con menos color y sobre todo, por la paciencia en mis días a mil por hora.

A la Dra. Victoria García y a la Dra. Eugenia Barrandeguy, por inculcarme las ganas de hacer docencia y tener las palabras justas en el momento indicado para no dejar ir la vocación, pero más que nada por transmitirme su formación en valores, que me hacen a mí, mejor persona y profesional.

A todos los integrantes del LaBiMAp, por estar siempre con todo y para todo.

A la Cátedra de Virología, por brindarme su espacio y acompañarme en mis días por la capital.

A mis amigas de toda la vida, por estar siempre presentes festejando cada logro y abrazando en cada traspie.

A mis amigos de la carrera, por haberse cruzado en mi camino y seguir, de cerca o de lejos, festejando los logros como si fueran parciales aprobados y las caídas como los recuperatorios a hacer frente y estudiar en grupo.

A mi gran familia, por estar siempre acompañando cada paso, pendientes de cada avance y sólo tener pensamientos positivos y mensajes de aliento. A mis abuelas que ya no están, pero que hace cinco años se emocionaron cuando empecé el doctorado.

Y por último, a mi pequeña y enorme familia, mi papá, mi mamá y mi hermana, porque sin ellos nada hubiera sido posible.

A todos ellos muchas gracias.

A mi abuelo

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados asociados a este trabajo de Tesis se han publicado parcialmente en los siguientes trabajos científicos:

- Publicaciones:

Badano I, **Sanabria DJ**, Totaro ME, Rubinstein S, Gili JA, Liotta DJ, Picconi MA, Campos RH, Schurr TG. Mitochondrial DNA ancestry, HPV infection and the risk of cervical cancer in a multiethnic population of northeastern Argentina. PLoS One. 2018 Jan 12;13(1):e0190966. doi: 10.1371/journal.pone.0190966. *Se adjunta separata.*

Badano I, Totaro ME, Culasso AC, **Sanabria DJ**, Schurr TG, Balette IC, Roisman A, Basiletti J, Picconi MA, Campos RH, Liotta DJ. Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. Infect Genet Evol. 2015 Jan;29:103-9. doi: 10.1016/j.meegid.2014.11.013. *Se adjunta separata.*

- Capítulos de libro:

Barrandeguy ME, **Sanabria DJ**, García MV. THE REVITALIZATION OF POPULATION GENETICS: FROM COALESCENCE THEORY TO PHYLOGEOGRAPHY. 2017. p1:10 eBook Population Genetics. SMGroup. *Se adjunta separata.*

- Subsidios

Tipo: Early Career Grant-National Geographic Society

Título: "HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) AS A MARKER OF HUMAN MIGRATION IN MISIONES (ARGENTINA)".

Institución donde se realiza el proyecto: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

Institución otorgante del subsidio: National Geographic Society. Committee for Research and Exploration

Duración: 1° noviembre de 2017 al 1 de noviembre de 2018.

Rol: Investigador Responsable

Resolución: HJ-075ER-17. *Se adjunta carta de adjudicación.*

Índice



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XIV
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	XVI
I-INTRODUCCIÓN.....	2
II-OBJETIVOS.....	37
III- MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
IV-RESULTADOS.....	51
V-DISCUSIÓN.....	77
VI-CONCLUSIONES.....	84
VII-BIBLIOGRAFÍA.....	87
VIII-ANEXOS.....	97

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XIV
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	XVI
I-INTRODUCCIÓN.....	2
1. PROVINCIA DE MISIONES.....	2
1.1 Características generales y ubicación geográfica.....	2
1.2 Historia del poblamiento de la provincia de Misiones.....	3
2. MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS EN ANTROPOLOGÍA MOLECULAR.....	8
2.1 ADN MITOCONDRIAL.....	8
Estructura genómica.....	8
Tipo de herencia.....	9
Tasa de mutación.....	10
El ADN mitocondrial y el estudio en poblaciones humanas.....	12
Antecedentes de estudios de ADN mitocondrial en Argentina y Misiones.....	16
2.2 POLIOMAVIRUS JC.....	18
Taxonomía.....	18
Estructura genómica.....	21
Ciclo de Infección.....	23
Epidemiología.....	24
Modelo de evolución viral.....	25
Antecedentes de estudios genéticos en virus JC en Argentina y Misiones.....	27
2.3 VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 16.....	28
Taxonomía.....	28
Estructura genómica.....	30
Ciclo de Infección.....	31
Epidemiología.....	32

Modelo de evolución viral	33
Antecedentes de estudios genéticos en HPV-16 en Argentina y Misiones.....	35
II-OBJETIVOS	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos.....	37
III- MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Obtención de muestras.....	39
Red de Provisión de Muestras, Tipos de muestra y consideraciones éticas.....	39
Puntos de Muestreo.....	40
Muestra analizada	43
2. Análisis moleculares	44
Extracción de ADN total	44
3. Análisis de los marcadores genéticos.....	45
3.1 ADN mitocondrial	45
3.2 Detección y caracterización de JCV	45
3.3 Detección y caracterización de HPV-16.....	45
4. Análisis Bioinformático.....	47
4.1 Análisis de secuencias	47
4.2 Análisis filogenético.....	47
4.3 Análisis de Coalescencia.....	47
4.3.1 Datación del ancestro común más reciente y estimación de la dinámica poblacional.....	47
4.4 Análisis de Redes (Network).....	48
5. Análisis estadístico de Estructura Poblacional	49
IV-RESULTADOS.....	51
1. Población de análisis:	51
2. Análisis de los marcadores genéticos.....	54
2.1 Análisis del ADN mitocondrial	54
2.2 Análisis del poliomavirus JC.....	57
2.3 Análisis del virus Papiloma Humano	60
3.2 Análisis de Coalescencia	63
3.2.1 Datación del ancestro común más reciente y estimación de la dinámica poblacional.....	63
3.3 Patrones demográficos. Análisis de Redes (network).....	71

3.4 Resumen de resultados obtenidos por los tres marcadores en el marco histórico del poblamiento de la Provincia.....	75
V-DISCUSIÓN	77
VI-CONCLUSIONES	84
VII-BIBLIOGRAFÍA	87
VIII-ANEXOS	97
ANEXO I- Consentimiento informado	98
ANEXO II- Ficha antropológica empleada en el muestreo.	100
ANEXO III- Protocolos de Biología Molecular utilizados en este trabajo de tesis.....	101
ANEXO IV- Secuencias de referencia disponibles en GenBank utilizadas en este trabajo de Tesis.....	107
ANEXO V- Árboles generados por el método NJ	112
ANEXO VI- Haplotipos del ADNmt.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización geográfica de la provincia de Misiones.....	2
Figura 2. “Frontera viva” entre Brasil y Argentina..	3
Figura 3. Movimientos migratorios del grupo lingüístico Tupí Guaraní.....	4
Figura 4. Corrientes Migratorias implicadas en el poblamiento de la provincia de Misiones.	6
Figura 5. Genoma mitocondrial.....	9
Figura 6. Herencia uniparental del ADN mitocondrial.	10
Figura 7. Distribución etno-geográfica de los haplogrupos mitocondriales.	13
Figura 8. Reconstrucción de las principales migraciones humanas prehistóricas.	15
Figura 9. Filogenia del ADN mitocondrial.....	16
Figura 10. Filogenia de la familia <i>Polyomaviridae</i>	20
Figura 11. Esquema del genoma de JCV.....	22
Figura 12. Migraciones humanas y distribución de los Tipos del poliomavirus JC (JCV).	26
Figura 13. Árbol filogenético del género <i>Alphapapillomavirus</i>	29
Figura 14. Diagrama del genoma del Papiloma Virus Humano tipo 16.	30
Figura 15. Ciclo de replicación del HPV.	31
Figura 16. Modelo esquemático de la progresión en la infección por HPV.	32
Figura 17. Migraciones humanas y distribución de variantes HPV-16.....	34
Figura 18. Localización geográfica de los puntos de muestreo dentro de la provincia de Misiones.	40
Figura 19. Vista aérea de la ciudad de Posadas.	41
Figura 20. Centro Suizo, ubicado en el municipio de Ruiz de Montoya.....	42
Figura 21. Parte de la costanera iguazucense frente a las tres fronteras	42
Figura 22. Familia del centro de la provincia de Misiones.	53
Figura 23. Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen VP1 del virus JC con secuencias de referencia publicadas en <i>Genbank</i> ..	58

Figura 24. Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen L1 de HPV-16 de Misiones.	61
Figura 25. Árbol datado (MCCT) obtenido a partir de las secuencias del gen VP1 de JCV circulantes en Misiones.....	64
Figura 26. Reconstrucción demográfica del virus JCV a lo largo del tiempo.....	66
Figura 27. Árbol datado (MCCT) obtenido a partir de las secuencias del gen L1 de HPV-16 circulantes en Misiones.....	68
Figura 28. Reconstrucción demográfica del virus HPV-16 a lo largo del tiempo	70
Figura 29: Análisis de Redes de haplotipos mitocondriales para la población de Misiones.	72
Figura 30. Análisis de redes para los tipos circulantes de JCV en Misiones mediante el método de Máxima Parsimonia.....	73
Figura 31. Análisis de redes para las variantes circulantes de HPV-16 en Misiones.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características socio-demográficas de la población objeto de estudio.	51
Tabla 2. ADN mitocondrial presente en la provincia de Misiones	55
Tabla 3. Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)	56
Tabla 4. Tipos y Subtipos de JCV detectados en este estudio.....	59
Tabla 5. Linajes y sublinajes de HPV-16 determinados en este estudio.	62
Tabla 6. Estimación de Edades de los ACMR de las variantes virales de JC circulantes en Misiones	65
Tabla 7. Estimación de Edades de los ACMR de las secuencias de HPV-16 en Misiones.....	69
Tabla 8. Orígenes geográficos del ADNmt, virus JC y HPV de Misiones.....	75

ABREVIATURAS

aC	antes de Cristo
ACMR	Ancestro Común Más Reciente (del inglés <i>most recent common ancestor</i>)
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
AMOVA	Análisis de la varianza molecular
ARN	Ácido ribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
BSK	Bayesian Skyline
HPD95%	Intervalo de máxima densidad posterior al 95% (highest posterior density 95 %)
HPV	Virus Papiloma Humano
RHV-I	Región Hipervariable I
RHV-II	Región Hipervariable II
JCV	John Cunningham Polyomavirus
MCCT	Maximum clade credibility tree
ML	Maximum Likelihood
NEA	Nordeste Argentino
NJ	Neighbor joining
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SNPs	Polimorfismos de Nucleótido Simple
s/s/a	Sustituciones por sitio por año
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
tMRCA	edad del ancestro común más reciente (del inglés time to the most recent common ancestor)
SRCr	Secuencia de Referencia de Cambridge revisada

RESUMEN

La población de la provincia de Misiones es resultado de un proceso de miscegenación que involucró indígenas de la familia lingüística Tupí Guaraní, conquistadores españoles del siglo XVI e Inmigrantes de diversos lugares de Europa (SXX); además su posición geográfica también ha favorecido la migración fronteriza, tanto de Brasil como de Paraguay. Actualmente, las comunidades Guaraníes se concentran en pequeños asentamientos asociados al remanente de selva, mientras que la población mestiza habita regiones urbanas y rurales. Esta situación supone un escenario único para estudios de Antropología y Epidemiología.

El ADN mitocondrial es un marcador genético ampliamente utilizado para la determinar la ancestralidad de las poblaciones en estudios de Antropología Molecular. La secuenciación de la región hipervariable del ADNmt ha permitido clasificar al mismo en 3 grandes linajes de origen asiático-americano, europeo y africano. El estudio de su frecuencia, distribución y evolución ha permitido comprender los patrones migratorios y el poblamiento antiguo y contemporáneo. Además, los virus JCV y HPV también han sido propuestos como modelos adecuados para estudios de Antropología, reconociéndose genotipos africanos, europeos, asiáticos y amerindios. El estudio del origen y dispersión de los virus que infectan a las poblaciones humanas resulta útil para comprender la historia demográfica de los mismos como así también la historia evolutiva de las poblaciones hospedadoras.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue realizar un aporte desde la genética a la historia del poblamiento de Misiones, mediante el análisis de un marcador genético humano y dos marcadores genéticos virales. Con este fin se realizó la caracterización genética de la población a través del ADN mitocondrial, como así también la determinación de las variantes circulantes de HPV-16 y de JCV presentes en población urbana de Misiones.

Se realizaron muestreos en 3 zonas geográficas de la provincia (sur, centro y norte). Los análisis moleculares se realizaron sobre el ADN total extraído a partir de estas muestras. Los linajes mitocondriales fueron determinados por amplificación de la región HV-I del ADNmt con posterior secuenciación. La caracterización genética del Poliomavirus JC, estuvo determinada por la amplificación del gen VP1 (proteína mayor de la cápside) y posterior análisis filogenético con secuencias disponibles en Genbank para determinar el origen geográfico de los tipos circulantes en la provincia de Misiones. Respecto a la caracterización de variantes circulantes de HPV-16, la misma se realizó a través de la amplificación y secuenciación del gen L1 (proteína mayor de la cápside);

posteriormente se realizó un análisis con la herramienta *online* Blast para asignar la variante geográfica correspondiente a cada secuencia. Además, se llevaron a cabo análisis estadísticos de estructura genética poblacional mediante análisis de varianza molecular, análisis bayesianos para datar el Ancestro Común Más Reciente de cada set de datos, sus reconstrucciones demográficas y finalmente un análisis de Redes para evidenciar procesos demográficos asociados a cada marcador en la población.

La historia del poblamiento de la provincia de Misiones se ve reflejada en los patrones genéticos arrojados por el ADNmt. Los 3 grandes linajes: asiático-americano, europeo y africano, están presentes en el pool génico de su población actual. Además, los marcadores genéticos virales también reflejaron los procesos demográficos propios de la provincia. En un contexto histórico, HPV-16 podría interpretarse como una fuerte irrupción del virus durante la colonización española (Siglo XVI) y/o la inmigración europea del Siglo XIX-XX. Por otra parte, la coexistencia de variantes introducidas y autóctonas de JCV en la población, refleja el perfil tri-híbrido de los procesos de poblamiento de Misiones, incluyendo nativos americanos (Guaraníes), inmigrantes europeos y migrantes fronterizos de Paraguay y Brasil. Estos resultados aportan nuevas perspectivas sobre el origen y composición genética de la población de Misiones, y las corrientes migratorias implicadas en el establecimiento de su población actual.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El análisis de la variabilidad genética de secuencias virales y su distribución geográfica aportan una nueva dimensión al estudio de las migraciones humanas y permite comprender los orígenes y la dispersión de diferentes genotipos virales (Holmes, 2004). En Antropología molecular, dos modelos virales han sido propuestos como útiles con este fin: el Poliomavirus John Cunningham (JCV) y el Virus Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16). Una serie de características convierten a estos virus en candidatos adecuados para estudios de coevolución: baja tasa de mutación (alrededor de 10^{-7} n/s/a), ausencia de recombinación y de salto interespecie. En conjunto, este modelo de evolución favorece la codivergencia entre virus y huésped (Holmes, 2004; Grenfell *et al.*, 2004).

La provincia de Misiones es un escenario interesante para estudios de genética de poblaciones y circulación viral; su población es consecuencia de un proceso de miscegenación que ha involucrado indígenas Guaraníes, conquistadores españoles e Inmigrantes de diversos lugares de Europa (suizos, alemanes, polacos, ucranianos, etc.); además su ubicación geográfica la hace propicia a recibir migrantes fronterizos tanto de Brasil como de Paraguay, constituyendo una dinámica poblacional única en la Argentina.

En la actualidad, las comunidades indígenas Guaraníes se concentran en pequeños asentamientos asociados al remanente de selva de la provincia, mientras que la población mestiza habita las regiones urbanas y rurales. Esta compleja situación ha sido abordada de distintos puntos de vista, principalmente demográfico, social, cultural; sin embargo, los estudios genéticos son escasos (Altuna *et al.*, 2006; Sala *et al.*, 2010; Mojsiejczuk *et al.*, 2016; Badano *et al.* 2015, 2018). En este sentido, el objetivo de este trabajo fue contribuir desde la genética a la historia del poblamiento de la provincia, a través del análisis de tres marcadores moleculares: el ADN mitocondrial, ampliamente utilizado para determinar la composición genética de las poblaciones, y dos marcadores virales, los cuales, a través de su caracterización complementan la historia evolutiva de su hospedador humano.

Introducción



I-INTRODUCCIÓN

1. PROVINCIA DE MISIONES

1.1 Características generales y ubicación geográfica

La provincia de Misiones se encuentra situada en la región noreste de la República Argentina compartiendo más del 90% de sus límites provinciales con la República del Paraguay (al oeste) y con el Brasil (al norte y al este). Al sudoeste limita con la provincia de Corrientes, constituyendo éste su único contacto con el resto del país (Figura 1).



Figura 1. Localización geográfica de la provincia de Misiones.

Posee una superficie de 29.801 km² y representa el 1.1% del territorio nacional. Su población es de 1.101.593 habitantes (547.335 hombres y 554.258 mujeres) y es la provincia con mayor cantidad de habitantes de la región Noreste de la Argentina, seguida por Chaco, Corrientes y Formosa (INDEC, 2010).

La frontera de Misiones presenta un marcado tránsito vecinal fronterizo (TVF) producto de las fluidas relaciones con los países limítrofes y con la provincia de Corrientes, particularidad por la cual se la denomina "Frontera Viva" (Figura 2). Esta característica demográfica no sólo afecta de manera directa, social y culturalmente a la región, sino también epidemiológicamente a nivel de salud pública.



Figura 2. “Frontera viva” entre Brasil y Argentina. La avenida izquierda corresponde a la República Federativa del Brasil, y la avenida derecha, a la Argentina. Frontera seca entre Bernardo de Irigoyen (Arg) y Dionisio Cerqueira (Br). Imagen tomada del Gran Atlas de Misiones 2015.

1.2 Historia del poblamiento de la provincia de Misiones

La población actual de Misiones se encuentra conformada por el componente amerindio original y por corrientes migratorias sucesivas ocurridas desde finales del siglo XIX. Actualmente esta situación se ve reflejada en la diversidad cultural, social y lingüística que se encuentra en la provincia. Para comprender la composición de la población debemos remitirnos a los procesos de poblamiento y colonización, a las distintas corrientes inmigratorias y a las migraciones internas, como así también al destino de los pueblos originarios de Misiones. En este sentido los patrones de ocupación del territorio, son claves por sentar las bases de la estructura y composición actual de la población.

- *Población Indígena de Misiones*

Los primeros pobladores de la región fueron los indígenas Guaraníes, de la familia lingüística Tupí Guaraní. Los Tupí Guaraní pertenecieron a uno de los tres grandes grupos étnicos que poblaban América del Sur aproximadamente 3.000 años aC (Andinos, Arawak y Tupí Guaraní). Se estima que antes del inicio de la Era Cristiana, se generó una expansión migratoria que produjo la escisión del grupo Tupí-Guaraní hace aproximadamente 1.800 años; los Tupíes fueron hacia el Este, hasta la Costa Atlántica, y hacia el Norte, tomando el curso del Amazonas; por otra parte, el grupo de los Guaraníes se desplazaron hacia el Oeste y Sudoeste, tomando la cuenca del Río de la Plata,

formando la "Sociedad Guaraní" (Figura 3). Se cree que la penetración cultural en el nordeste argentino habría alcanzado la "Cuenca del Plata" hasta la llegada de los europeos en el año 1530.

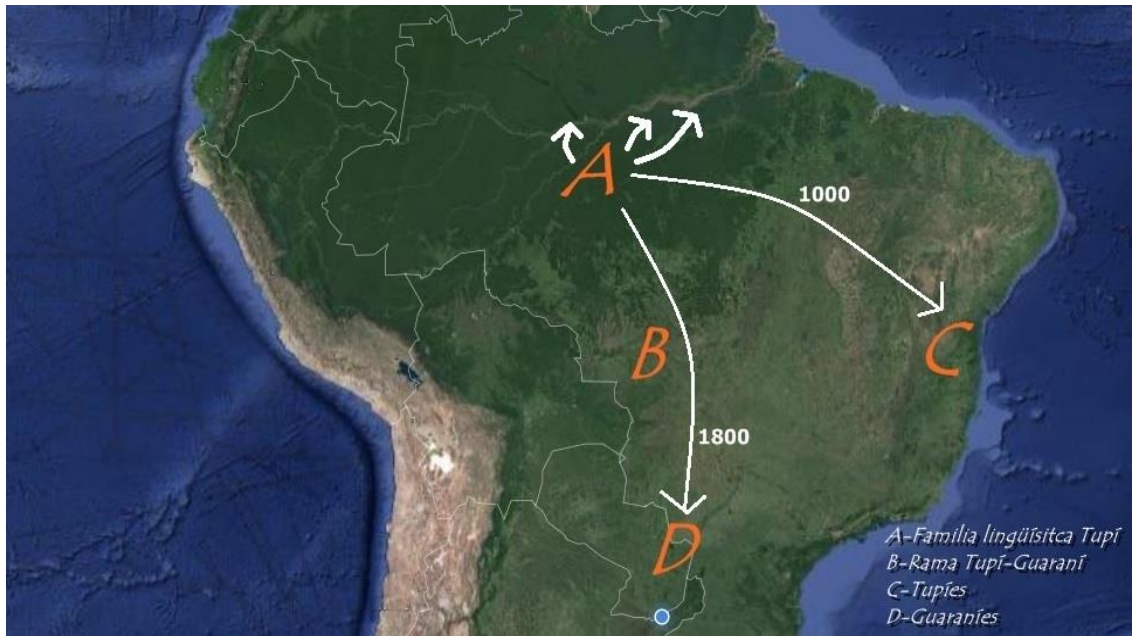


Figura 3. Movimientos migratorios del grupo lingüístico Tupí Guaraní. Los años corresponden a "años antes del presente". Imagen Adaptada de Marrero, 2007.

Durante la época de la colonización (Siglo XVI), algunos grupos guaraníes asentados en los márgenes de los ríos Paraná y Uruguay fueron incorporados a las Misiones Jesuíticas, donde permanecieron alrededor de dos siglos, mientras que otros grupos permanecieron aislados, escondidos en la selva (Marrero *et al.*, 2007). Con la dispersión de la población guaraní, se inició también un lento proceso de mestizaje en los propios pueblos: los guaraníes que emigraron -en su gran mayoría, hombres-, españolizaron sus apellidos, tratando de confundirse de este modo con la población "blanca", al tiempo que un gran número de españoles que llegó a esta región a residir efectivamente tomaron como esposas a las mujeres indígenas que habían permanecido en su tierra ancestral durante el proceso migratorio (Gran Atlas de Misiones, 2015).

Con respecto a la población indígena actual asentada en la Provincia de Misiones, ésta no debe ser considerada como continuación temporal de los aborígenes que poblaron las Reducciones Jesuíticas (los cuales migraron o fueron exterminados durante los conflictos nacionales o internacionales que padeciera la región), sino que constituye un re-poblamiento del territorio a partir de 1870 por parte de los Guaraníes del Paraguay. Estas tribus no pasaron por las encomiendas españolas ni por las misiones jesuíticas (Martínez-Sarazola, 1992).

Según el Censo 2004 – 2005 de la Dirección General de Asuntos Guaraníes de Misiones, la cifra total de individuos es de 4.900 (1.100 familias) distribuidos en 60 a 80 asentamientos asociados al remanente de selva de la provincia. Por otra parte, según datos suministrados por el INDEC, en el censo del año 2010, los individuos que se reconocen como descendientes de pueblos originarios ascienden a 13.006 personas (6.777 hombres y 6.229 mujeres).

- *Población mestiza de la Provincia:*

Durante la segunda mitad del Siglo XVIII, Misiones fue el centro de colonización más importante de la campaña Jesuítica en el Este de América del Sur. Luego de la expulsión de la Orden de los Jesuitas, se vuelve un territorio despoblado. En el período posterior a la Revolución e Independencia Argentina, el territorio sufre numerosos enfrentamientos armados, siendo la guerra de la Triple Alianza (1864-1870) el evento más influyente en el poblamiento de la provincia, ya que durante el mismo parte del territorio es perdido y reconquistado numerosas veces. En el período posterior a la guerra, llegan a la provincia grupos provenientes de Paraguay (asentándose en la margen del río Paraná), pobladores del Brasil (en la zona del Alto Uruguay) y argentinos procedentes de localidades próximas conformando lo que se conoce como “poblamiento espontáneo” (Schiavoni, 2015).

En ese entonces Misiones “apenas podía ser considerada argentina desde el punto de vista de la composición de su población”, siendo la mayoría de sus habitantes criollos, pobladores ilegales paraguayos y brasileños mezclados con aventureros y proscriptos de la provincia vecina de Corrientes (Bartolomé, 2000).

En 1876, el Presidente Nicolás Avellaneda promulgó la Ley de Inmigración y Colonización, que fomentó la inmigración de colonizadores europeos a partir de facilitarles el acceso a la propiedad de las tierras. Esa fue la primera corriente inmigratoria masiva, denominada oficial y que comprendió el periodo entre los años 1883 y 1927. La Colonización oficial de la Provincia se caracterizó por la llegada de alemanes, italianos, franceses, polacos, suecos, vascos, españoles, suizos y galitzianos (polacos y ucranianos). Ocuparon principalmente el Sur de Misiones, avanzando hacia el centro de la provincia (Bartolomé, 1975).

La segunda corriente inmigratoria se dio entre los años 1920 y 1945, y se denominó privada, la fomentaron compañías colonizadoras particulares, principalmente alemanas. La misma estuvo ligada al desembarco de daneses, suizos, alemanes, suecos, japoneses, noruegos, finlandeses y eslavos. Estos grupos se asentaron principalmente en la zona del Alto Paraná y luego fueron descendiendo hacia el centro de la provincia (Figura 4). Luego de este periodo continúan arribando inmigrantes europeos, de manera menos numerosa, aunque no menos importante. Se instalaron principalmente en la zona

central de Misiones. Se debe destacar también las migraciones internas que ocurren en el territorio, ya sea por el crecimiento de la población, como también por la búsqueda y ocupación de nuevas tierras para su explotación (Bartolomé 1982).

La provincialización del Territorio en el año 1953, "...no hizo más que reforzar un escenario territorial a partir de la coexistencia de la diversidad de clases y etnias diferenciadas; habitantes referenciados como europeos o su descendencia, argentinos, aborígenes y migrantes limítrofes". Dicha constitución multifacética en términos de "pertenencias" nacionales, es la que dará a Misiones un perfil particular de pluralismo sociocultural..." (Gallero & Krautstolf, 2010).



Figura 4. Corrientes Migratorias implicadas en el poblamiento de la provincia de Misiones.

En la actualidad, en la provincia se presenta un notorio descenso de población extranjera respecto a los períodos de inmigración masiva en la Argentina, hacia fines del siglo XIX, cuando la mitad de la población misionera era foránea, según el censo de 1895.

Al respecto, datos arrojados por el Censo 2010 describen la situación actual en cuanto a población extranjera de la provincia:

- El 4 % de la población de Misiones no nació en Argentina; es decir, 44.012 habitantes.

- El 92,4 % de los extranjeros de Misiones, nació en países contiguos a la Argentina: en valores absolutos, 40.660 ciudadanos de la provincia son oriundos de países limítrofes. En este sentido, Paraguay es el país que más extranjeros aporta al total de la población de Misiones (2,4 %), seguido por Brasil (1,2 %). Respecto a aquellos nacidos en Europa, españoles y alemanes son los que se destacan, seguidos de representantes de la comunidad asiática.

- En cuanto a la distribución por sexo de los extranjeros en Misiones, el 52,6 % de ellos está integrado por mujeres, mientras que el 47,4 % restante lo conforman varones.

Sin embargo, el destino e idiosincrasia de los moradores de Misiones se vio influido de manera determinante por las corrientes migratorias ocurridas en su territorio, las cuales alteraron por completo su paisaje y la fisonomía de su gente, quienes fueron incorporando los ideales del cooperativismo y las experiencias técnicas realizadas en Europa, Asia y países limítrofes.

Por ello, Misiones ofrece un escenario particular para realizar estudios de Antropología molecular ya que su población representa un paisaje étnico particular que refleja la profundidad histórica construida en base a los asentamientos de la población originaria y de los grupos de migrantes que arribaron a la Provincia (Gallero & Krautstolf, 2010).

2. MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS EN ANTROPOLOGÍA MOLECULAR

La disciplina Antropología molecular es un campo de investigación relativamente nuevo que surge en las últimas décadas del Siglo XX como respuesta a la conjunción de datos moleculares en el contexto de la evolución humana. El término fue introducido formalmente por Emil Zuckerkandl en el simposio "*Classification and Human Evolution*" (Austria, 1962) y se define como "el estudio de la variación y evolución humana usando herramientas moleculares". En este contexto, el uso de marcadores genéticos uniparentales, como el ADN mitocondrial y el cromosoma Y, han sido de gran utilidad para reconstruir la historia de las poblaciones humanas y los procesos de poblamiento asociados a ellas. Recientemente, se han incorporado nuevas aproximaciones mediante el uso de marcadores virales, del sistema inmune (genes HLA), entre otros (Alegre *et al.*, 2007; Badano *et al.*, 2012; Mojsiejczuk *et al.*, 2016).

2.1 ADN MITOCONDRIAL

Las mitocondrias son organelas celulares que presentan un rol clave en la biología celular, incluyendo la producción de ATP, generación de especies reactivas de oxígeno, mantenimiento de la homeostasis del Ca²⁺ y la regulación de vías de muerte celular (Scheffler, 1999). Las mitocondrias poseen su propio genoma, constituido por ADN circular de 16.569 pares de bases (pb) de longitud, que codifica 37 genes y puede encontrarse en una o varias copias.

La secuencia genómica de la mitocondria humana fue la primera en ser conocida en forma íntegra. Una versión corregida de la primera secuencia completa obtenida recibe el nombre de Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (SRCr) (Andrews *et al.* 1999). Los polimorfismos detectados son marcados como diferencias (sustituciones) a la SRCr (van Oven, 2009).

Estructura genómica

El genoma mitocondrial consiste en un 90% de regiones codificantes (13 proteínas, 2 ARNs ribosomales y 22 ARNs de transferencia), mientras que el genoma restante consiste en una región no codificante de aproximadamente 1100 pb (región control) y varios segmentos pequeños no codificantes que se encuentran distribuidos entre los genes (Pakendorf *et al.*, 2005) (Figura 5). La región control contiene el origen de replicación y presenta la mayor tasa de mutación (5 a 10 veces mayor que los genes nucleares) (Brown *et al.*, 1979). Dentro de la región control se diferencian dos zonas intercaladas ampliamente conservadas que separan a otras tres de mayor tasa

mutacional denominadas regiones hipervariables. La región hipervariable I (RHV-I) comprende al menos los sitios entre las posiciones 16024-16365, la RHV-II se expande entre las posiciones 73 y 340 y la RHV-III entre 438 y 576 (Lutz *et al.* 1998). La RHV-III es utilizada generalmente en aquellos organismos que no presentan diferencias en las regiones I y II (Lutz *et al.*, 2000).

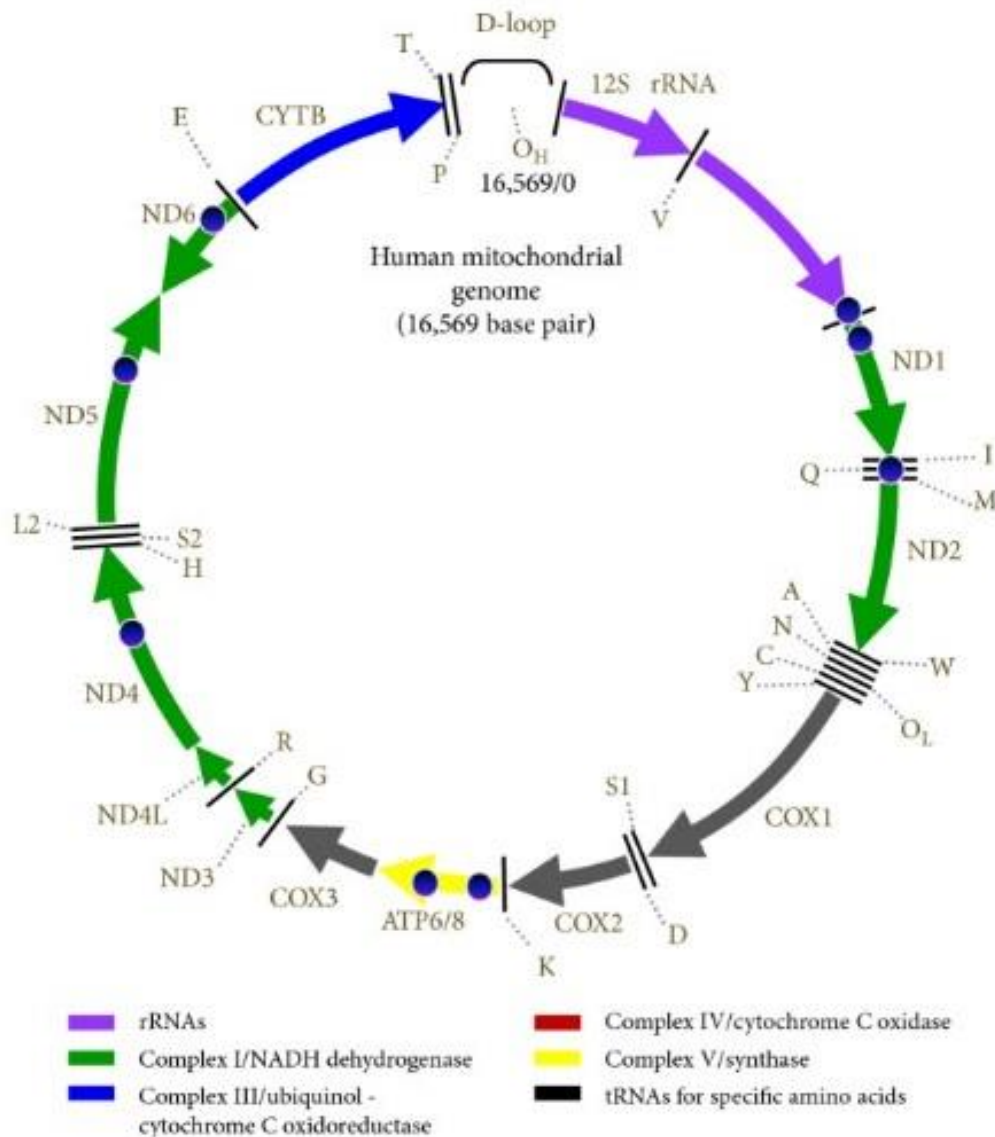


Figura 5. Genoma mitocondrial. Esquema tomado de Lee & Han, 2017.

Tipo de herencia

El ADNmt posee un tipo de herencia particular, el cual es heredado por vía materna ya que sólo el óvulo aporta las mitocondrias durante la formación del cigoto (Figura 6). Este modo de herencia uniparental y su naturaleza haploide facilita la interpretación de las relaciones ancestro-descendencia dentro de un linaje, porque evita

las distorsiones que provoca la herencia biparental producto de la recombinación (Pakendorf *et al*, 2005).

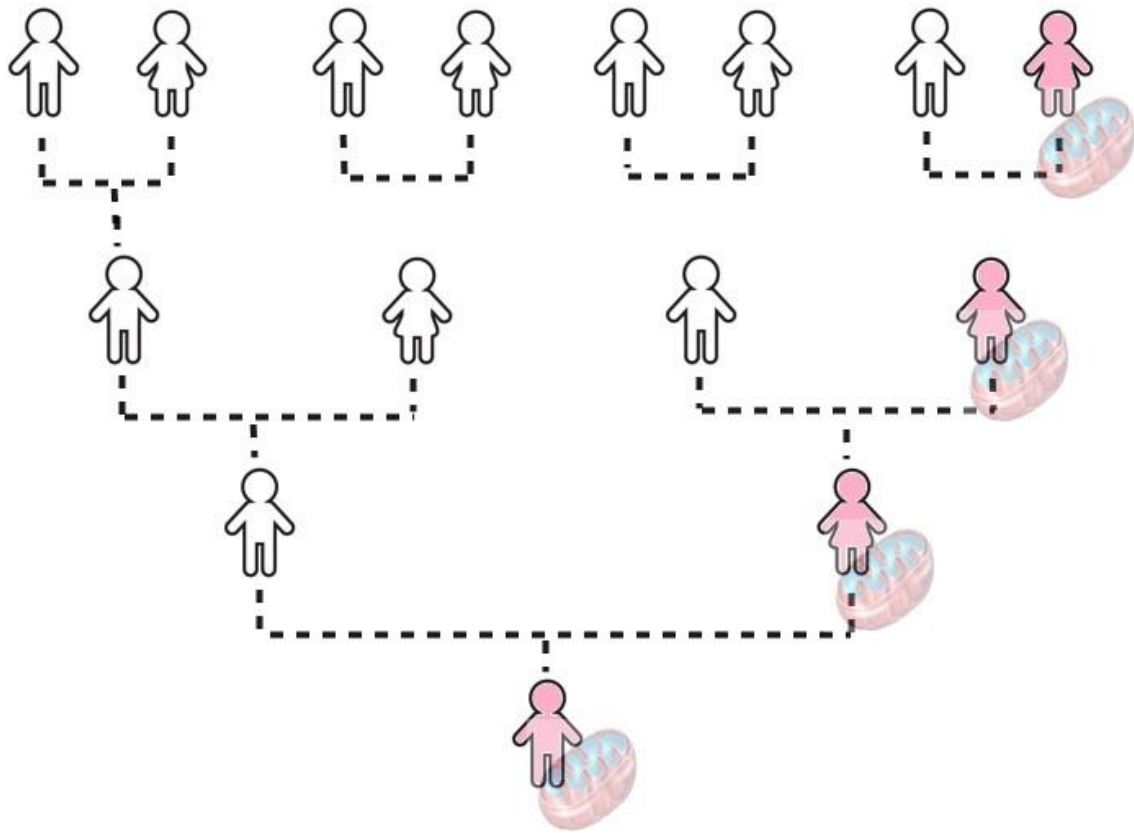


Figura 6. Herencia uniparental del ADN mitocondrial.

Con respecto al número de linajes de ADNmt transmitidos de madres a hijos, el mismo también es restringido y genera dos tipos de estados respecto al genoma mitocondrial: Homoplasmia y Heteroplasmia.

La homoplasmia, es el estado en el cual un individuo posee todas las mitocondrias con el mismo genoma, lo que sucede en mayor frecuencia en las poblaciones, mientras que la heteroplasmia se da cuando existe diferente proporción de genomas mitocondriales mutados en cada célula, tejido o individuo. Esta última tiene una ocurrencia menos frecuente en las poblaciones, sin embargo es importante desde el punto de vista clínico ya que las enfermedades mitocondriales están asociadas generalmente al grado de heteroplasmia del individuo (la proporción de alelos mutados difiere notablemente entre los descendientes de una misma generación, Zhang, 2018).

Tasa de mutación

Respecto a la tasa de mutación que presenta el genoma mitocondrial, la misma ha sido establecida de acuerdo a la tasa de sustitución de la región codificante como

$1,26 \times 10^{-8}$ sustituciones por sitio por año (Mishmar *et al.*, 2003). Esta tasa de mutación asume una relación lineal entre la acumulación de sustituciones y el tiempo. Un problema observado con esta tasa es que omite una significativa fracción de información útil, la de la región no codificante (alrededor de un tercio de la variación), la cual podría ser útil para aumentar la precisión de estimaciones de edad (Soares *et al.*, 2009).

Kivisild y col (2006), propusieron una nueva calibración para genomas de ADNmt humanos basada en la tasa de acumulación de mutaciones sinónimas. Sin embargo, esta tasa utiliza una fracción más pequeña del genoma mitocondrial, lo que reduce aún más la precisión. Por otra parte, la falta de ajuste entre esta tasa y una serie de patrones filogeográficos bien establecidos, como los determinados para Europa al final de la última glaciación, lleva a la sospecha de que dicha calibración puede estar sobreestimada (Soares *et al.*, 2009).

Recientemente Soares y col, en 2009, recalibraron el reloj molecular de ADNmt, incorporando los fósiles más recientes que evidencian el tiempo de separación Homo-Pan. También, de forma independiente, estimaron nuevas tasas de mutaciones sinónimas y para la región control. Esta metodología fue re-evaluada con estudios filogeográficos y en evolución humana para verificar la nueva cronología propuesta.

De esta manera, las tasas de mutación establecidas para el ADN mitocondrial son:

Región	Tasa de mutación
RHV-I	1.64273×10^{-7}
RHV-II	2.29640×10^{-7}
Región control (por fuera de la RHV I y II)	1.54555×10^{-8}
Genes que codifican proteínas (1° y 2° posición en el codón)	8.87640×10^{-9}
Genes que codifican proteínas (3° posición en el codón)	1.92596×10^{-8}
ADNr	8.19696×10^{-9}
ADNt	6.91285×10^{-9}
otros	2.48537×10^{-8}

Adaptado de Soares *et al.*, 2009.

El ADN mitocondrial y el estudio en poblaciones humanas

Polimorfismos del ADN mitocondrial, haplotipos y haplogrupos mitocondriales

Los estudios genéticos del genoma mitocondrial han permitido identificar dos tipos de polimorfismos en su secuencia:

1) Polimorfismos de 1 nucleótido (SNPs): se refieren a mutaciones puntuales, que a su vez pueden ser transiciones o transversiones. La mayoría de estos polimorfismos se encuentran en la región control o *D-loop* y las transiciones son las más frecuentes.

2) Polimorfismos de longitud: se refieren a la variación en la longitud de la secuencia dentro de la región control, debida a inserciones o deleciones de una o más bases, generalmente citosinas (Meyer *et al.*, 1999).

En Genética de Poblaciones, al analizar la variación de los genomas mitocondriales, éstos son clasificados como haplotipos y haplogrupos. Un haplotipo es la combinación de cambios nucleotídicos o mutaciones en la secuencia de bases mitocondriales (por ejemplo de la región RHV-I). Un conjunto de haplotipos que comparten una serie de mutaciones que habrían estado presentes en un ancestro común se denomina haplogrupo (Torroni *et al.*, 2006). Estos haplogrupos se caracterizan por presentar una distribución etno-geográfica restringida (Figura 7); a continuación se detallan los haplogrupos descriptos y el linaje que representan:

Linaje	Haplogrupos
Asiático-americano	A, B, C, D
Europeo	H-I-J-K-M-P-T-U-V-W-X
Africano	L0, L1, L2 y L3

*(Schurr *et al.*, 1990; Torroni *et al.*, 1993, 1996)

En América, los nativos del continente pertenecen a uno de los 4 haplogrupos de origen asiático: A, B, C y D (Torroni *et al.*, 1992), pero sin embargo los haplotipos encontrados presentan un elevado nivel de diferenciación entre poblaciones (Marrero *et al.*, 2007). De este modo, para diferenciarlos de los Asiáticos, estos haplogrupos han sido denominados Pan-Americanos (A2, B2, C1 y D1) (Achilli *et al.*, 2008). También se ha determinado que un pequeño grupo de amerindios de Norteamérica pertenecen al haplogrupo X (Brown *et al.*, 1998).

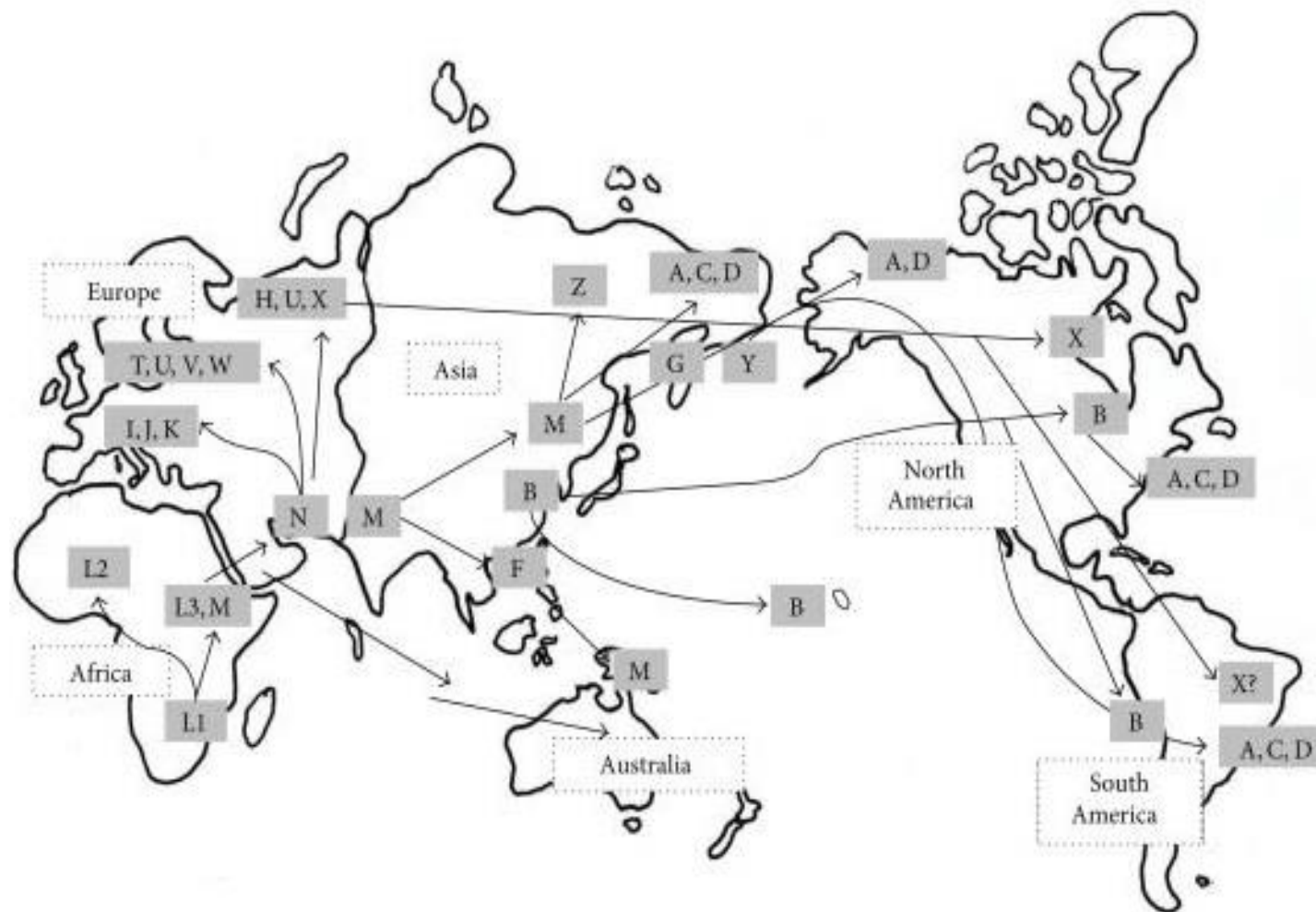


Figura 7. Distribución etno-geográfica de los haplogrupos mitocondriales.

Modificado de Caldarazzo Ienco *et al.*, 2011.

Filogenia del ADN mitocondrial

En el marco de la hipótesis de "Fuera de África" (*Out of Africa*), *Homo sapiens* evolucionó en una única región de África hace 100.000 a 150.000 años. Al abandonar el continente, 50.000 a 60.000 años atrás (Figura 8) estas poblaciones reemplazaron a lo largo de su recorrido a los homínidos arcaicos, como *Homo erectus*. Durante esta travesía, las mutaciones que se fueron acumulando en su ADN mitocondrial dieron origen a los haplogrupos característicos de las poblaciones de diferentes regiones geográficas. La clasificación actual reconoce a los haplogrupos L0, L1, L2, y L3 como los principales haplogrupos africanos. L0 y L1 tendrían una antigüedad aproximada de 100.000 años, mientras que L2 y L3 serían más recientes (59.000-78.000 años). Los primeros humanos modernos que salieron de África eran portadores del Haplogrupo L3. Al abandonar el continente, L3 dio origen a 2 haplogrupos importantes: M y N (ambos de aproximadamente 60.000 años de antigüedad) que colonizaron el resto de los continentes. El haplogrupo M es considerado un linaje euro-asiático oriental aunque se encuentra virtualmente ausente en Europa. Esto se debe a que los portadores del haplogrupo M, comenzaron una larga migración costera hacia el Este a través del medio oriente y del Sur de Eurasia, llegando finalmente a Australia y Polinesia. Durante este recorrido, dio origen a los haplogrupos derivados M1 y Q (europeos) y C, D, E, G, Z (asiáticos).

Por otra parte los haplogrupos europeos H, PR-EHV, V, P, T, J, U, K, I, W, X y Asiáticos A, B, F, R, Y, N, R, poseen un nodo filogenético en el haplogrupo N. De todos ellos, el haplogrupo H es el más frecuente del continente Europeo en una proporción de aproximadamente 40% (Torroni *et al.*, 2006).

En América, los estudios de la diversidad del ADNmt han revelado que todos los nativos del continente pertenecen a uno de los 4 haplogrupos de origen asiático: A, B, C y D (Torroni *et al.*, 2006). Estos haplogrupos probablemente surgieron en las altiplanicies de Asia Central, entre el mar Caspio y el lago Baikal y poseen una antigüedad de 50.000 a 60.000 años. Los grupos nómades, llevaron estos haplogrupos con ellos y lo dispersaron en diversas áreas de Asia Oriental hasta Siberia. Estos haplogrupos habrían llegado a América apenas en los últimos 15.000 a 20.000 años, y una vez allí se dispersaron rápidamente. Para diferenciarlos de los Asiáticos, estos linajes han sido denominados Pan-Americanos. Estos haplogrupos Pan-Americanos corresponden a los linajes derivados A2, B2, C1 y D1. La edad estimada es similar (18.000-24.000 años) con un valor promedio de 20.000 años (Achilli *et al.*, 2008). También se ha determinado que un pequeño grupo de amerindios de Norteamérica pertenecen al haplogrupo X.

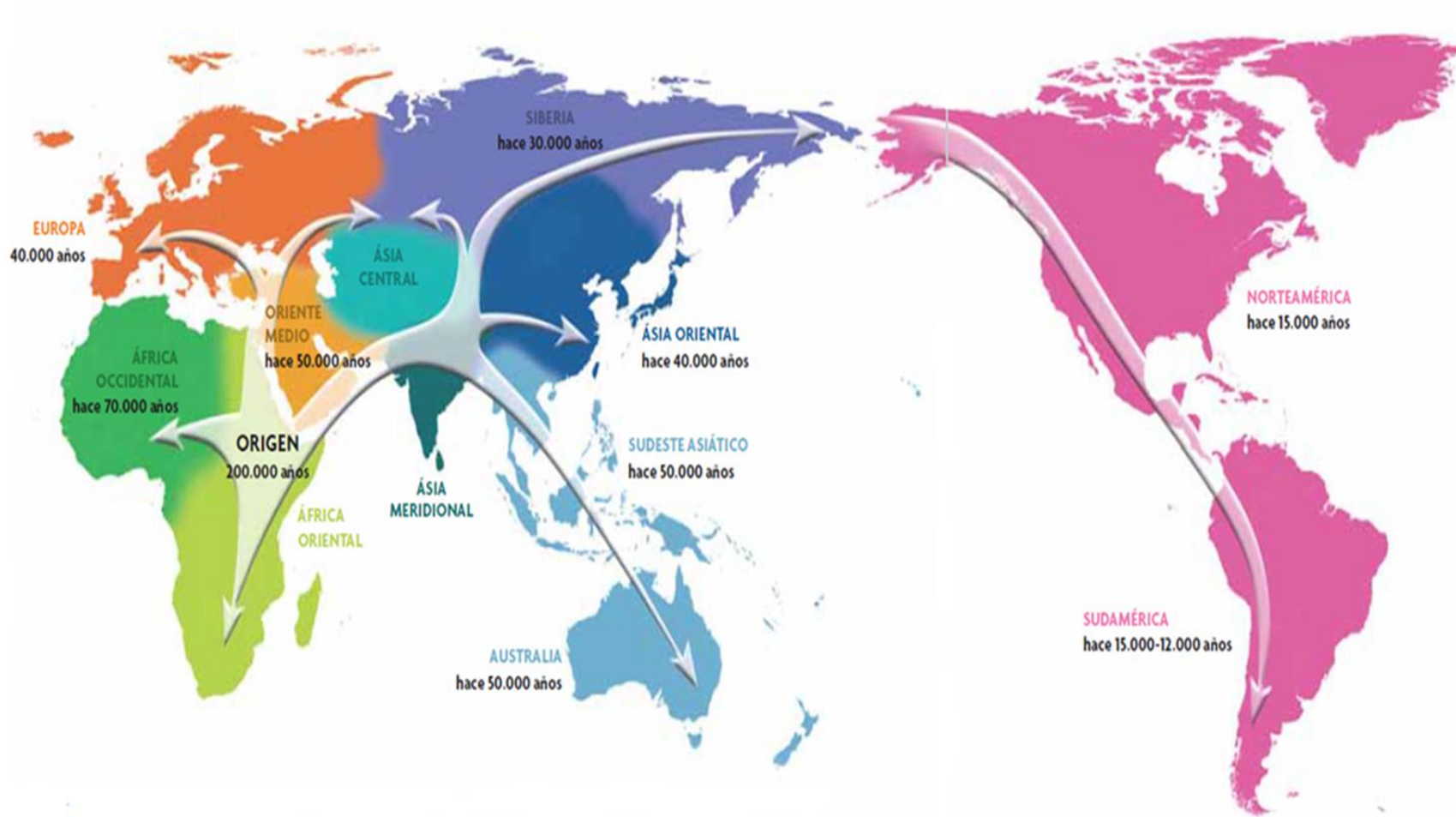


Figura 8. Reconstrucción de las principales migraciones humanas prehistóricas. Tomado de Comas, 2014.

Así, la variación en la secuencia del ADN mitocondrial (resultado de la acumulación secuencial de mutaciones a lo largo de linajes de herencia materna), pueden ser representadas en un árbol (Figura 9) donde los linajes más ancestrales corresponden a los haplogrupos Africanos (L) y los más modernos a los linajes Pan-Amerindios (A, B, C y D) (Bandelt *et al.*, 2005, 2006; Kivisild *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2006; Richards *et al.*, 2002; Salas *et al.*, 2007; Torroni *et al.*, 2006).

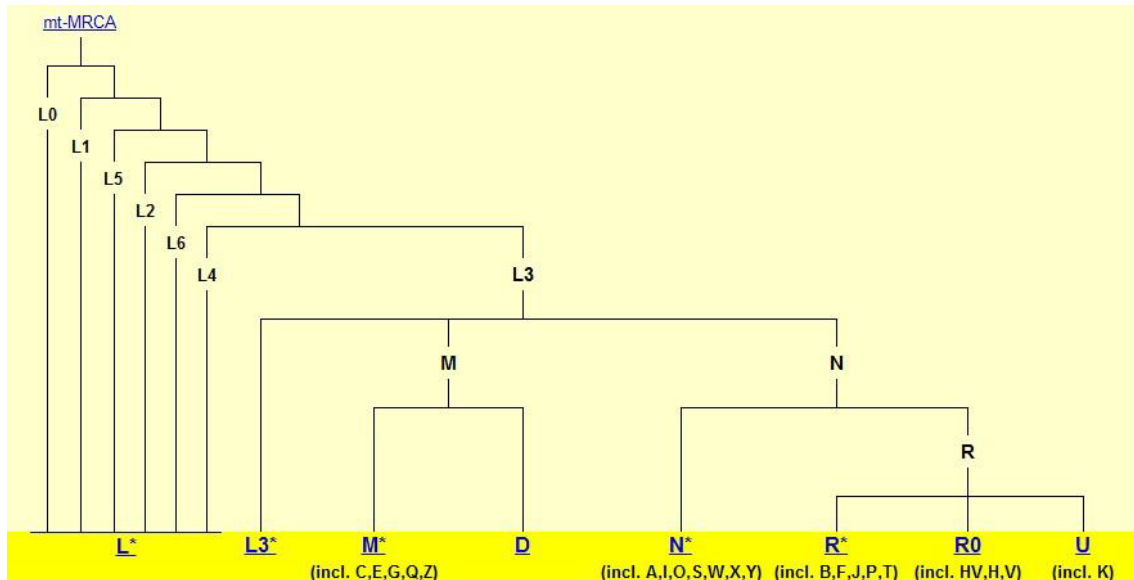


Figura 9. Filogenia del ADN mitocondrial.

Antecedentes de estudios de ADN mitocondrial en Argentina y Misiones

Estudios multicéntricos a nivel nacional respecto al ADN mitocondrial, reportan que la contribución al linaje asiático-americano es del 53,7%, mientras que los linajes europeo y africano se ven representados en un 44,3% y 2%, respectivamente (Corach *et al.*, 2010; Catelli *et al.*, 2011).

Recientemente se ha publicado un estudio de ADN mitocondrial de la población del centro de la Argentina, donde se observa que el 76% de las mitocondrias de los individuos muestreados corresponden a linajes de origen asiático-americano, y a su vez destaca que este porcentaje varía aún dentro de la misma región (92,9% en Santiago del Estero y 87,2% en San Luis) respondiendo a la migración europea recibida en dichos lugares (García *et al.*, 2018).

Los estudios genéticos en Misiones se han centrado fundamentalmente en las poblaciones amerindias guaraníes (variación a nivel de ADNmt, autosomas y de marcadores del cromosoma Y), y se han descrito una alta frecuencia de linajes del ADNmt de origen nativo americanos (en particular haplogrupo A), y una baja frecuencia de linajes de origen europeo (1-2%). Este patrón genético estaría en concordancia con

sus orígenes históricos y las actuales prácticas socio-culturales de vivir en asentamientos de selva y evitar el contacto sistemático con el hombre blanco. Por otra parte, al analizar marcadores patrilineales (cromosoma Y) se encontraron aportes europeos mayores, del 14,7% indicando una mayor introgresión de genes Europeos por línea paterna (Altuna *et al.*, 2006; Diez Repetto, 2004; Sala *et al.*, 2010).

Trabajos preliminares de nuestro grupo han analizado la variación genética del ADNmt en mujeres pertenecientes a 3 poblaciones de la provincia de Misiones: (i) "Urbanas" de la ciudad de Posadas (ii) "Colonas" descendientes de inmigrantes suizos del interior de la provincia y (iii) "Guaraníes" habitantes de la Selva Misionera. Los resultados indicaron que en mujeres Guaraníes, los linajes amerindios representaban el 99%, con un 1% europeo. En mujeres Colonas, el 40% presentaban linajes amerindios y 60% europeos. En mujeres Urbanas, sin embargo, se determinó un patrón tri-híbrido con un 68,6% amerindio, 26,1% europeo y 5,3% africano (Badano *et al.*, 2018).

2.2 POLIOMAVIRUS JC

El poliomavirus JC (JCV) fue el primero de los 12 poliomavirus detectados en humanos, en 1964, a partir de partículas virales reveladas por microscopía electrónica en tejidos cerebrales de un paciente que presentaba leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML) (Hirsch *et al.*, 2013).

JCV es el agente etiológico de una enfermedad desmielinizante fatal del sistema nervioso central conocida como Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (Asseta *et al.*, 2017). Además de la PML, se han reportado otras enfermedades asociadas a JCV: neuropatía de células granulares del virus JC (GCN), encefalitis por el virus JC, meningitis por el virus JC y nefropatía asociada a JCV (Tan y Koralnik, 2010).

Al igual que muchos otros virus de ADN, JCV explota la maquinaria de la célula huésped para llevar a cabo la replicación del ADN viral. Las proteínas virales específicas pueden modular el ciclo celular para inducir la fase S, lo que ha llevado a investigar un posible vínculo entre la infección por JCV y cáncer. Sin embargo, aún no se ha establecido un vínculo causal entre JCV y cáncer a pesar de la evidencia de ADN y proteínas virales en tejidos tumorales humanos (Delbue *et al.*, 2017).

Taxonomía

El virus JC pertenece a la familia *Polyomaviridae*, la cual comprende una pequeña familia de virus no envueltos de ADN doble cadena, que se clasifican en 4 géneros *Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Gammapolyomavirus* y *Deltapolyomavirus* cada uno delimitado de acuerdo a las relaciones filogenéticas de la secuencia aminoacídica del antígeno tumoral LTA_g (Figura 10) (Buck *et al.*, 2016; Calvignac Spencer *et al.*, 2016; ICTV, 2018). Este nuevo criterio de clasificación taxonómica se basa en la distancia genética observada entre las secuencias codificantes del antígeno T grande (LTA_g) y en el hospedador natural de la especie viral. Brevemente, cuando la distancia genética entre dos secuencias, previamente identificadas como miembros de la familia *Polyomaviridae*, es mayor al 15%, éstas se consideran como miembros de distinto género viral. En el caso que la distancia genética sea menor al 15%, ciertas propiedades biológicas entre las que se destaca la especificidad de hospedador, pueden justificar la creación de una especie nueva.

Específicamente JCV pertenece al género *Betapolyomavirus*, el cual alberga cerca de 20 especies de virus que infectan mamíferos. Es, junto al virus BK, uno de los poliomavirus humanos más estudiados (ICTV, 2018; Calvignac Spencer *et al.*, 2016).

Recientemente fue adoptado un nuevo criterio de nominación para las especies de poliomavirus. La mayoría de los nombres ahora consisten en una combinación del

nombre de la especie hospedadora latinizada (la mayoría de los poliomavirus son especie-específicos) y el término "poliomavirus", seguido de un número que refleja el orden de descubrimiento.

En consecuencia, el virus JC (JCV) comúnmente conocido como John Cunningham paso a denominarse "Poliomavirus Humano 2" (JC virus, JCV, JCV) (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV; Moens *et al.*, 2017).

Dado que el ICTV no reconoce taxones por debajo del nivel de especie, la variación intra-específica de JCV ha sido descrita en base al análisis de diferentes regiones genómicas del ADN viral, resultando en diferentes clasificaciones de tipo clínico y/o evolutivo las cuales coexisten en la actualidad (Yogo *et al.*, 2008)

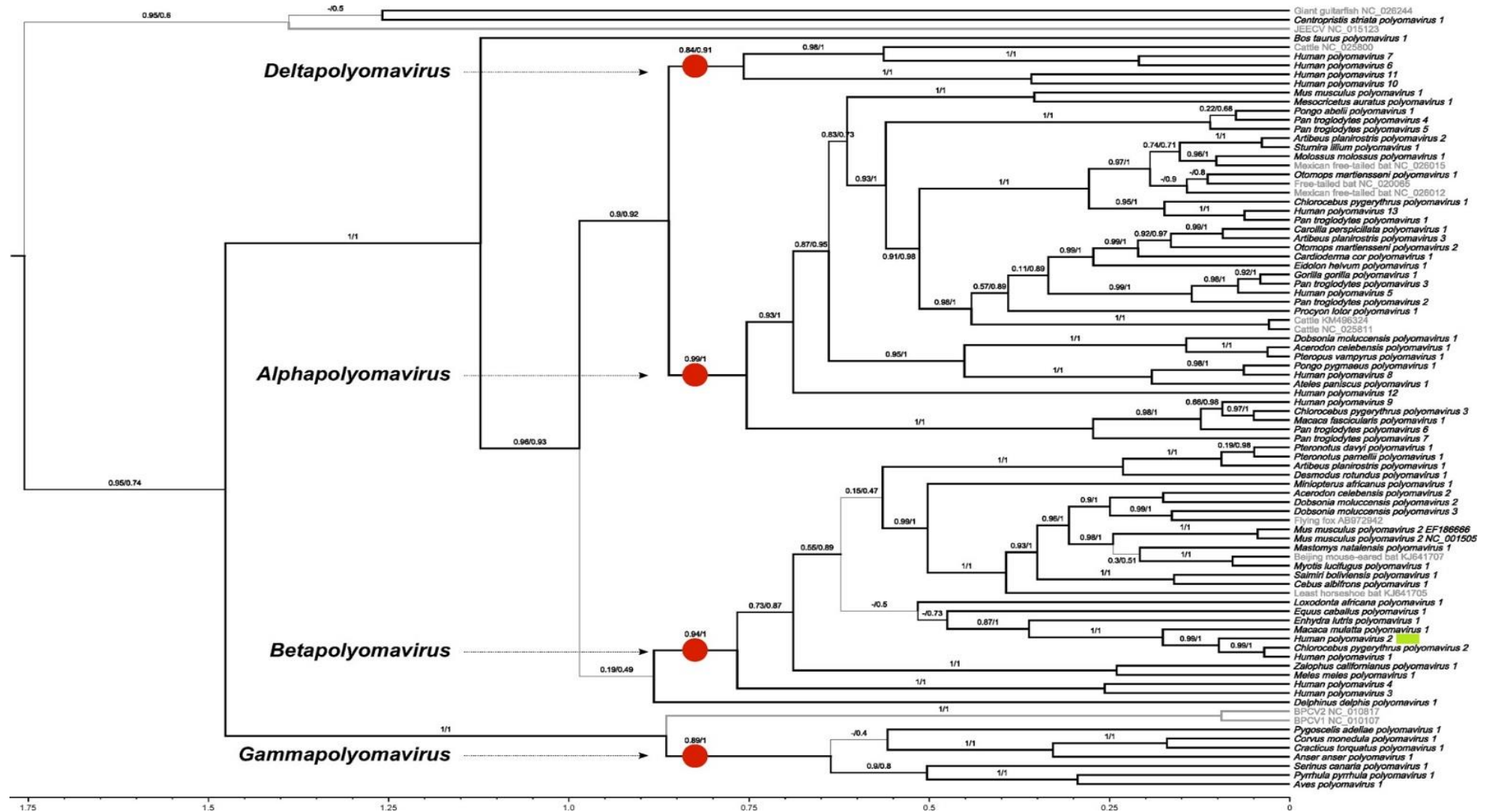


Figura 10. Filogenia de la familia *Polyomaviridae*; en verde se indica la especie JCV (*Human Polyomavirus 2*). Adaptado de Calvignac-Spencer *et al*, 2016.

Estructura genómica

El genoma del virus JC posee un tamaño de 5.130 pb y la secuenciación del primer genoma completo fue realizada por Frisque *et al.*, 1984 (Figura 11).

Estructuralmente el genoma puede dividirse en las siguientes regiones (White y Khalili, 2011):

I. La región control/reguladora no codificante (NCCR), donde se encuentran el origen de replicación, los sitios de inicio de la transcripción y las secuencias promotoras para todos los genes virales. Los análisis demuestran que esta secuencia posee una alta tendencia a mutar, alterando las propiedades patógenas del virus, entre otras.

II. La región temprana de transcripción, que codifica el antígeno T grande (LTag) y T pequeño (sTag), proteínas funcionales que facilitan la replicación del genoma viral, entre otros.

III. La región tardía de transcripción, que codifica las proteínas estructurales que forman la cápside (VP1, VP2 y VP3) y una agnoproteína. (Yogo *et al.*, 2004; Dalianis & Hirsch, 2013; Moens *et al.*, 2017).

IV. La región Intergénica (IG): la cual se encuentra ubicada entre los nucleótidos 2122 y 2731 del genoma viral, abarcando 400pb en posición 3' del gen VP1, la región intergénica entre VP1 y LTag (75 pb) y 135pb en posición 3' del gen LTag (Ault *et al.*, 1992).

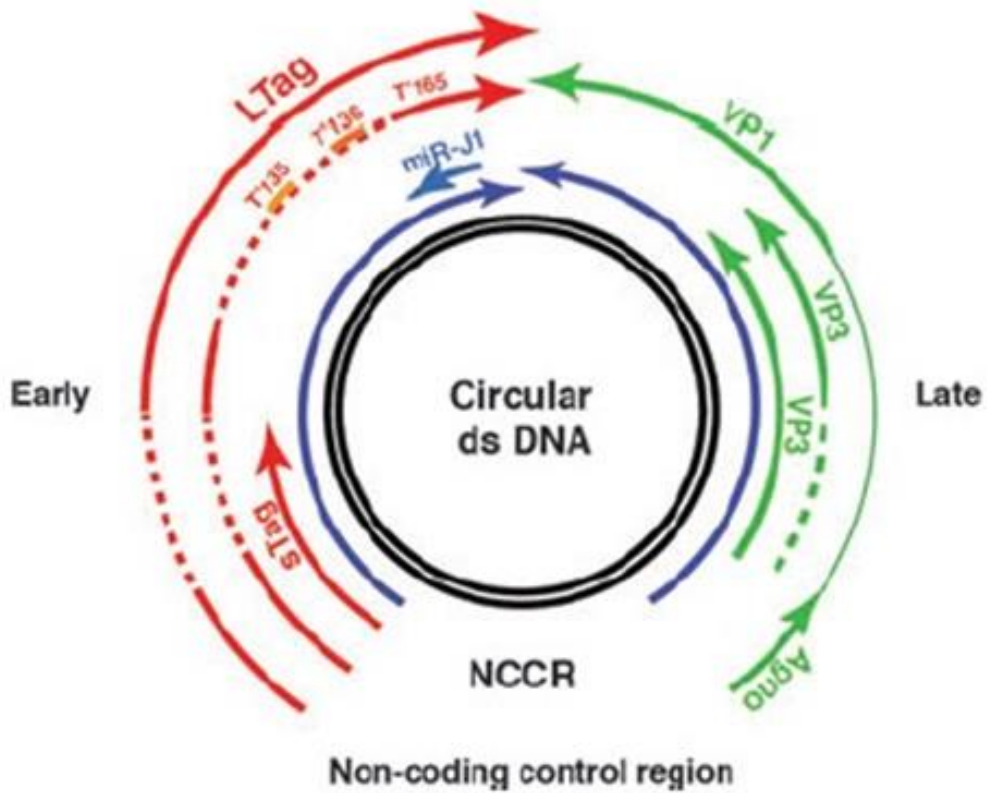


Figura 11. Esquema del genoma de JCV.
Tomado de Hirsch *et al*, 2013

Ciclo de Infección

La infección por JCV es especie-específica, ocurriendo naturalmente sólo en el ser humano. El ciclo de infección es aún motivo de estudios. La presencia de JCV en tejido amigdalino ha llevado a proponer que el ingreso del virus al organismo es por vía oro-faríngea, posiblemente junto a la ingesta de bebidas y/o alimentos contaminados. El virus presenta un amplio tropismo, infectando varios órganos y tejidos (riñones, medula ósea, tejido linfoide, etc.) donde permanece latente durante toda la vida de los individuos infectados. Una pequeña cantidad del virus continúa replicándose en los tejidos renales y es excretado regularmente en orina, completando su ciclo de infección mediante su diseminación al medio (Berger *et al.*, 2017, López Hernández, 2012).

Así, JCV se transmite horizontalmente durante largos periodos de cohabitación, generalmente dentro del grupo familiar (dinámica que simula una transmisión de tipo vertical) o de las comunidades. De esta manera cada variante viral presenta una distribución etno-geográfica restringida (Holmes, 2004; Yogo *et al.*, 2004, Zheng *et al.*, 2004). Esta característica ha resultado clave para su uso como marcador de los movimientos poblacionales de sus hospedadores humanos.

Importancia clínica

La infección es generalmente asintomática, a excepción de individuos inmunocomprometidos, donde puede ser agente causal de la Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (PML), una enfermedad fatal que produce un daño degenerativo del sistema nervioso central (SNC) (Berger *et al.*, 2017).

El rol etiológico del virus JC en el desarrollo de PML fue establecido en 1971, pero no fue hasta el comienzo de la pandemia del SIDA en los años 80 que su infección tomó relevancia médica. En estos casos el virus atraviesa la barrera hematoencefálica e infecta el cerebro del paciente, iniciando un ciclo lítico que infecta y destruye los oligodendrocitos del SNC. Las lesiones que provoca se caracterizan por ser de progresión rápida y simultánea en varias áreas del cerebro (multifocales), visualizándose en estudios de imagen como manchas blancas (leuco del griego *leukós* -blanco-), producto de la destrucción de la sustancia blanca del cerebro (encefalopatía). Aunque una reversión del estado inmunológico puede frenar el avance de la enfermedad, las secuelas neurológicas producidas son irreversibles (Padgett *et al.*, 1971; Sabath & Major, 2002; Cedeno *et al.*, 2006; White & Khalili, 2011; López Hernández, 2012; Lima, 2013). A pesar de su mal pronóstico, la PML afecta menos del 5% de las personas inmunocomprometidas y no tiene incidencia en la población sana, como la objeto del presente estudio.

Epidemiología

JCV infecta a sus huéspedes humanos y establece un ciclo replicativo persistente después de la infección aguda, que favorece su diseminación dentro de las poblaciones humanas y su paso a través de generaciones. Aunque se sabe que JCV infecta a más del 50% de la población humana adulta, la PML es una enfermedad de muy baja frecuencia. (Cayres-Vallinoto *et al.*, 2016)

Los datos epidemiológicos de JCV en Argentina son escasos. Existen sólo 3 reportes publicados de casos clínicos puntuales de PML con confirmación de la infección por JCV: dos de ellos en pacientes VIH positivos (1987 y 2013) y uno en un paciente sin inmunosupresión (Sambuelli, *et al.*, 1987; Lopez *et al.*, 1985; Corti *et al.*, 2013).

La escasez de registros podría explicarse por la baja incidencia de la PML en la población general, así como al sub-registro. Esto último se debe a que esta enfermedad se desarrolla en un contexto de inmunosupresión severa junto a otras enfermedades oportunistas, por lo que las personas fallecen de causas múltiples y no se llega a diagnosticar correctamente la PML.

Respecto a estudios epidemiológicos de JCV en poblaciones de la Argentina, a la fecha existen sólo dos trabajos publicados: Albizua Verdinelli *et al.*, (2016) y Bonaventura *et al.*, (2017).

Brevemente, Albizua Verdinelli y colaboradores realizaron un estudio en la ciudad de Córdoba donde se analizó la prevalencia de infección de JCV en sangre de individuos VIH positivos. Las determinaciones se realizaron por PCR en el gen LTA_g. Se consideró a la viremia de JCV en sangre como un factor de riesgo a padecer PML y un indicador indirecto del estado del sistema inmune. De las 107 muestras estudiadas, 6,94% fueron positivas para JCV. En base a estos resultados la población fue caracterizada como de bajo riesgo de desarrollar PML (Albizua Verdinelli *et al.*, 2016).

Bonaventura y colaboradores analizaron 895 casos con patología neurológica de la provincia de Buenos Aires (periodo 2006-2016). Las determinaciones se realizaron mediante una Nested-PCR dirigida a una porción del gen LTA_g. Obtuvieron resultados positivos para JCV en 92 pacientes (el 10% de la población de estudio). Sobre este grupo, el 99% era VIH positivo, confirmando una estrecha relación existente entre ambas infecciones (Bonaventura *et al.*, 2017).

No existen registros de la enfermedad por JCV en la provincia de Misiones.

Modelo de evolución viral

El estudio del origen, emergencia y dispersión de los virus que infectan a las poblaciones humanas es una de las áreas más activas y crecientes en la biología evolutiva moderna (Holmes, 2008). Así, el análisis de la diversidad viral resulta de utilidad para evaluar la historia evolutiva, esclarecer la epidemiología de las enfermedades humanas y mejorar la comprensión de comportamiento biológico en relación a su interacción con el hospedador (Zhou & Holmes, 2007).

Particularmente en el caso del Poliomavirus JC es posible observar un patrón filogeográfico particular donde se observan 3 grupos principales: África (Tipos 3 y 6), Asia (Tipo 2) y Europa (Tipos 1 y 4) (Hirsch *et al.*, 2013) (Figura 12). Su diversidad genética se ve reflejada en la existencia de siete genotipos principales (1-7) donde cada uno presenta de uno a cinco subtipos. La presencia de subtipos europeos, asiáticos y africanos asociados al origen étnico de las poblaciones remarcan la idea de que JCV es un buen marcador para estudiar la migración de las poblaciones humanas, reflejando su historia reciente y tardía (Cayres-Vallinoto *et al.*, 2016). El grado de similitud entre los subtipos permitió la predicción de genomas JCV ancestrales lo cual podría correlacionarse con la aparición de la especie humana en África y la subsiguiente diversidad étnica siguiendo patrones de migración pre-históricos e históricos en todo el mundo (Sugimoto *et al.*, 1997, 2002; Stoner *et al.*, 2000; Agostini *et al.*, 2001).

Si bien existen controversias acerca de la congruencia de patrones demográficos del virus y su hospedador humano (Holmes, 2004), el virus JC ha sido ampliamente usado en estudios de Antropología en poblaciones de Amerindios, Melanesios y Asiáticos, entre otras (Fernandez-Cobo *et al.*, 2001 y 2002; Stoner *et al.*, 2000; Agostini *et al.*, 1997).

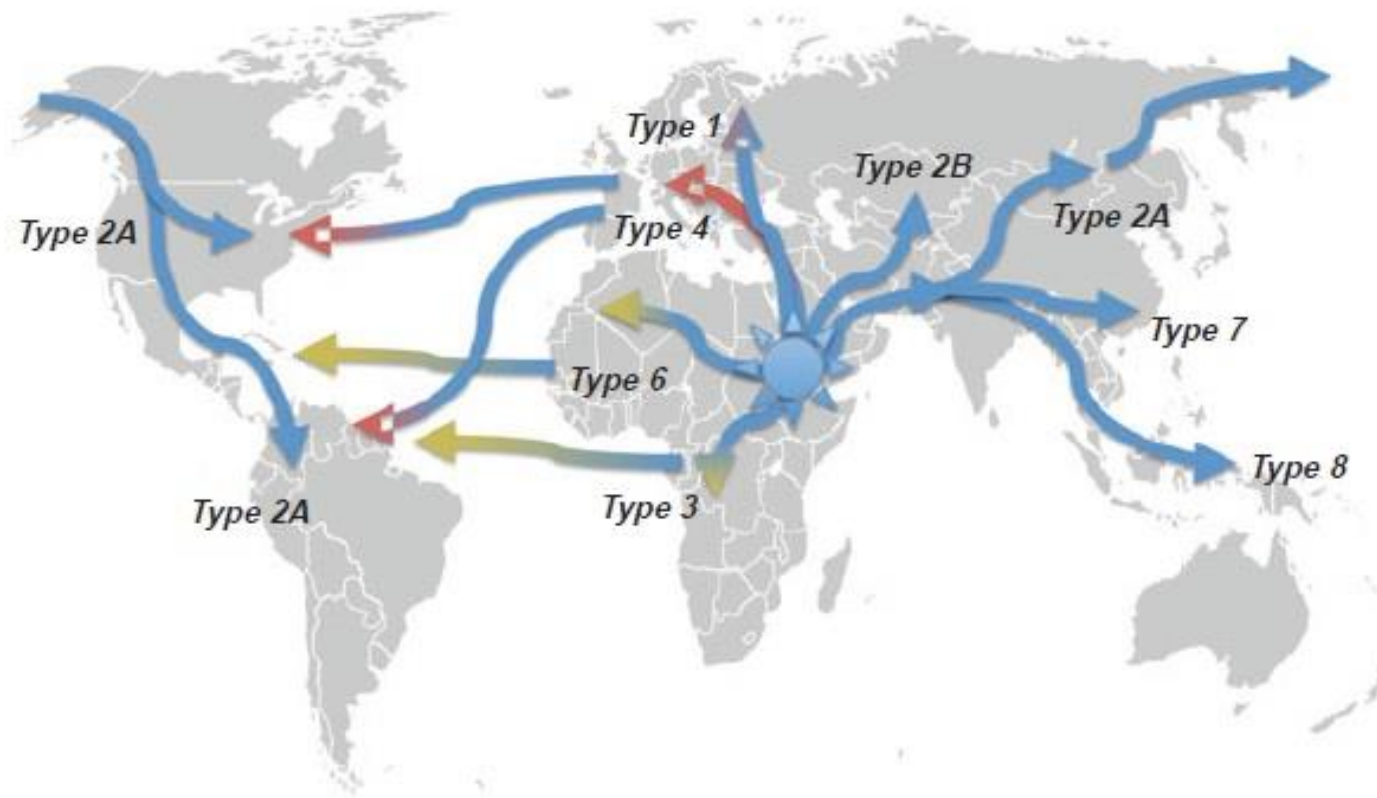


Figura 12. Migraciones humanas y distribución de los Tipos del poliomavirus JC (JCV).
Tomado de Hirsch, 2013.

Antecedentes de estudios genéticos en virus JC en Argentina y Misiones

A nivel nacional existe un único reporte de estudios genéticos en virus JC. Torres *et al.*, 2016 analizaron muestras ambientales (agua de ríos y efluentes cloacales) y en individuos con infección por VIH de la ciudad de Buenos Aires. Detectaron una prevalencia de JCV del 63,3% en muestras de orina, 83,3% en muestras de efluentes cloacales y entre un 20-85% en muestras de río tomadas en diferentes periodos. Sobre esta muestra heterogénea, los linajes virales fueron caracterizados mediante la amplificación por PCR anidada en el gen VP1. Los análisis filogenéticos indicaron la presencia de los tres grandes linajes de JCV circulando en la población estudiada: asiático-americano, europeo y africano. En los tres grupos de estudio fue predominante la frecuencia del linaje de origen amerindio (66-90%). Los linajes de origen europeo fueron detectados solo en aguas residuales con una prevalencia de aproximadamente 33%, mientras que los linajes de origen africano fueron los menos representativos, identificados en la población VIH positiva y en aguas de río con una prevalencia del 10 al 25%. Estos resultados podrían interpretarse como el patrón propio de las poblaciones mezcladas de Argentina, producto de las principales corrientes implicadas en el poblamiento de nuestro país (Torres *et al.*, 2016).

Los estudios sobre el virus JC en la provincia de Misiones son escasos. Únicamente existe un estudio publicado en una comunidad indígena del centro de la provincia (Fernandez-Cobo *et al.*, 2002), donde obtuvieron un 38% de prevalencia de virus JC y la caracterización filogenética de las secuencias a través del análisis del gen VP1, arrojó que todas pertenecían al Tipo 2A del linaje asiático-americano.

Además, estudios realizados por nuestro grupo en población mestiza de Misiones utilizando la región intergénica del genoma viral como marcador molecular, informaron una prevalencia del 20,7% en población general. Los resultados filogenéticos indicaron que el 65% de las muestras presentaban linajes de origen asiático-americano, 30% linajes de origen europeo y 5% linajes de origen africano.

2.3 VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 16

Los Virus Papiloma Humano (HPVs) pertenecen a la Familia *Papillomaviridae* (de Villers *et al.*, 2004) y pueden ser clasificados en virus de "alto riesgo", "alto riesgo probable" y "bajo riesgo". El HPV tipo 16 pertenece a los denominados de "alto riesgo" (HPV-HR del inglés *High Risk*). Su estudio reviste importancia por ser uno de los principales responsables del desarrollo de cáncer de cuello uterino (IARC, 2017). Su principal vía de transmisión es genital-sexual y se encuentra en el tracto genital inferior del 3,6% de la población femenina asintomática y el 50% de los carcinomas a nivel mundial (WHO/ICO, 2017).

Taxonomía

El virus papiloma humano pertenece a la Familia *Papillomaviridae*, la cual comprende virus pequeños, sin envoltura, con genomas de ADN bicatenario de 5748 a 8607 pb, su clasificación se basa en la homología de secuencias de ADN a través del marco de lectura abierto del gen L1. Los miembros de esta Familia infectan principalmente epitelios mucosos y queratinizados, y se han aislado de peces, reptiles, aves y mamíferos; sin embargo, a pesar de una larga historia co-evolutiva con sus huéspedes, algunas especies de papilomavirus son patógenos de su huésped natural.

La clasificación taxonómica actual (revisada por la ICTV en 2018) se basa en la secuencia nucleotídica del gen L1. Los miembros de las diferentes subfamilias presentan menos del 45% de identidad en sus secuencias; así HPV-16 pertenece a la subfamilia *Firtpapillomavirinae*, al género *Alphapapillomavirus*, y es reconocido dentro de la especie *Alphapapillomavirus 9*.

Un género agrupa todos los tipos virales que comparten menos del 60% de identidad nucleotídica con respecto al gen L1. Las especies que se agrupan dentro de un mismo género comparten entre un 60%-70% de identidad nucleotídica con respecto al gen L1. Cada especie viral está conformada a su vez por tipos virales.

Los miembros del género *Alphapapillomavirus* (Figura 13) infectan la mucosa oral y/o genital de humanos y primates no humanos. Algunos, además se encuentran en lesiones cutáneas y miembros específicos (por ejemplo *Alphapapillomavirus 7* y *Alphapapillomavirus 9*) son considerados oncogénicos ya que se encuentran regularmente en tejidos cancerosos (Van Doorslaer *et al.*, 2018).

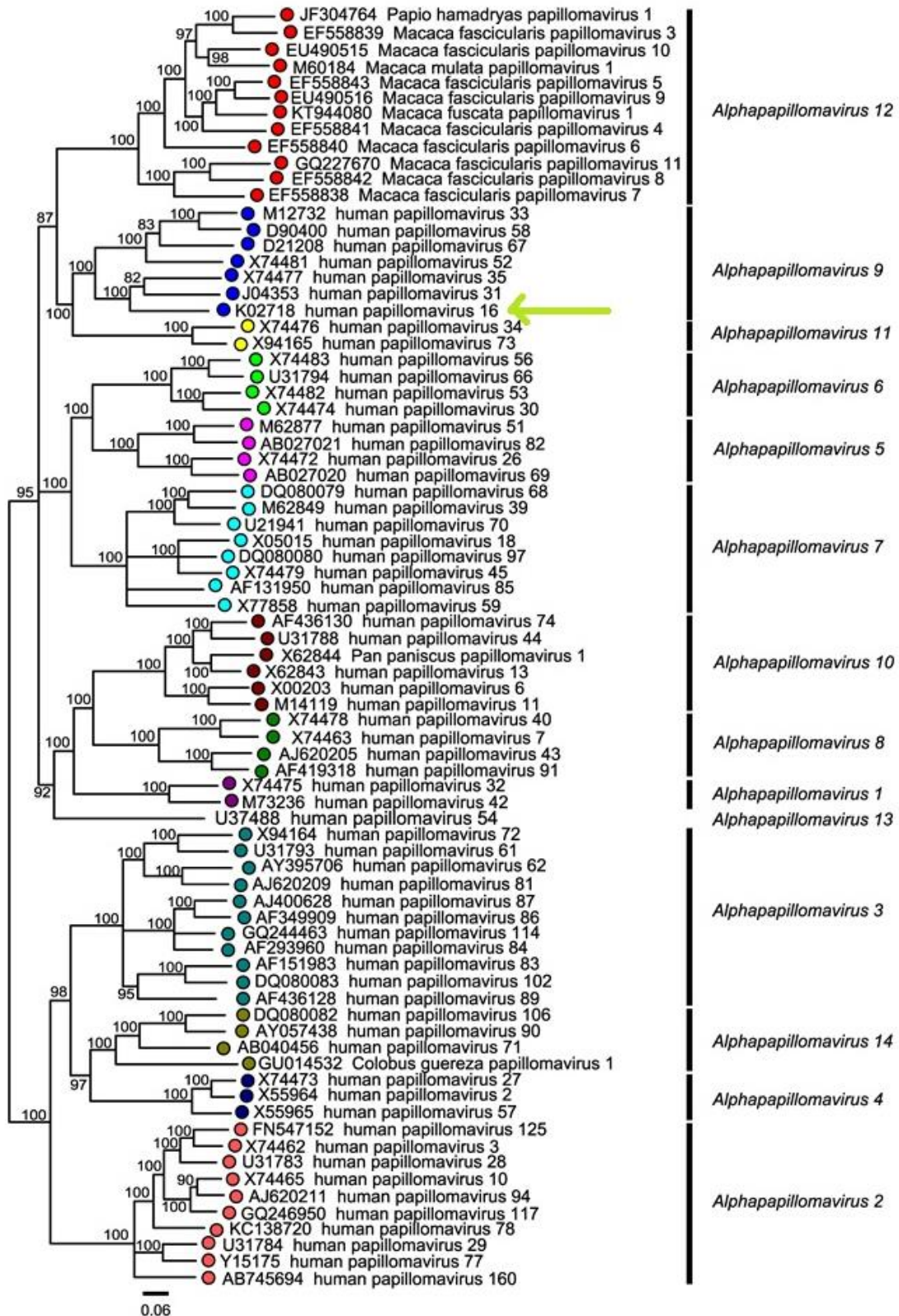


Figura 13. Árbol filogenético del género *Alphapapillomavirus*. Con una flecha verde se indica el HPV-16. Adaptado de Van Doorslaer *et al.*, 2018.

Estructura genómica

Son virus de ADN de genoma circular, doble cadena de aproximadamente 8Kb. Sólo una de las cadenas es transcripcionalmente activa y contiene 8 genes (Figura 14).

A efectos funcionales, el genoma viral puede dividirse en 3 regiones:

- 1- una Región Temprana o E (del inglés *Early*) de 4.000 pb aproximadamente, que codifica 6 proteínas reguladoras (E1, E2, E4, E5, E6, E7);
- 2- una Región Tardía o L (del inglés *Late*) de alrededor de 3.000 pb que codifica dos proteínas estructurales (L1 y L2);
- 3- una Región Larga de Control o LCR (Long Control Region) de 1.000 pb que contiene elementos en cis y regulan la replicación y expresión génica del virus (zur Hausen,2000).

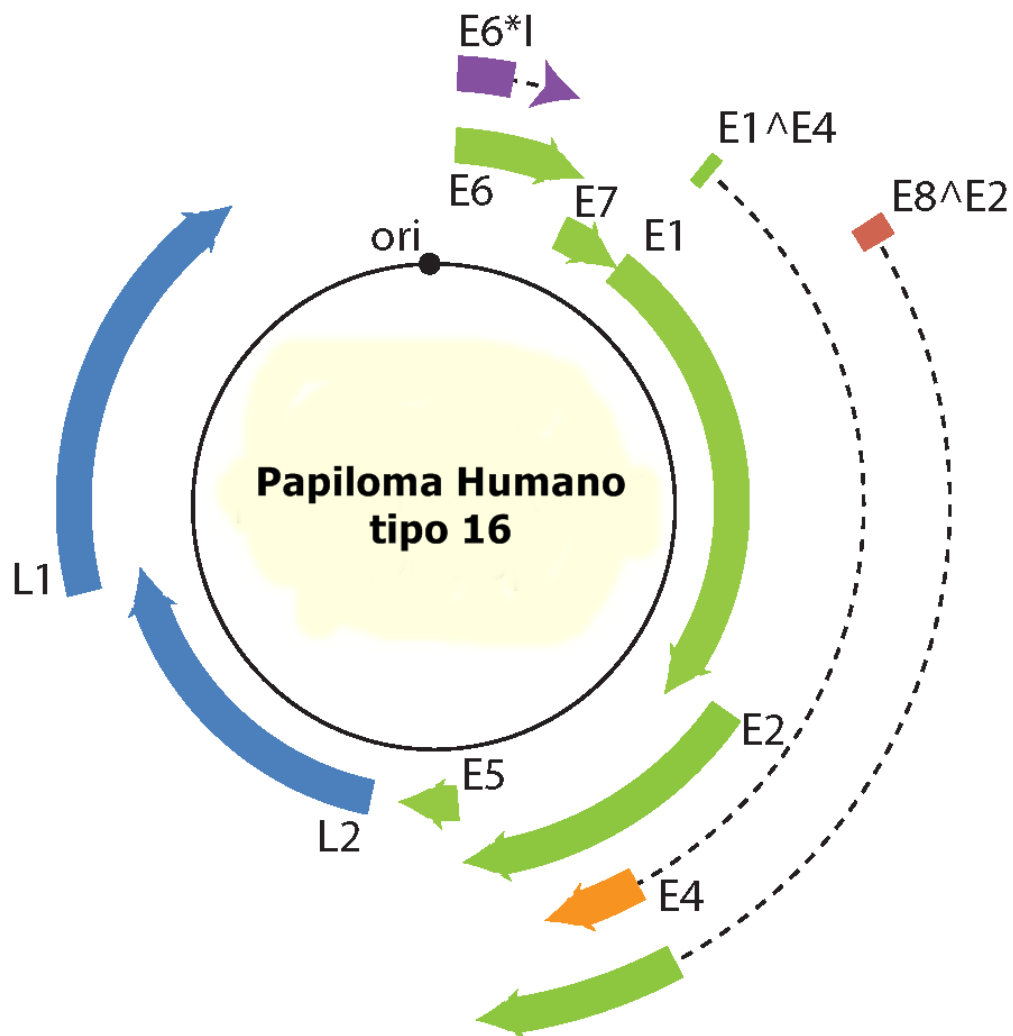


Figura 14. Diagrama del genoma del Papiloma Virus Humano tipo 16. Adaptado de Van Doorslaer, *et al.*, 2018.

Ciclo de Infección

La infección por HPV está ampliamente distribuida en la población general, siendo la infección de transmisión sexual más frecuente. Se estima que más del 70% de las personas sexualmente activas tendrán contacto con el virus en algún momento de la vida (Koutsky *et al.*, 1997).

Durante el contacto sexual se generan pequeñas lesiones o microtraumas en la mucosa genital permitiendo el ingreso del virus a la capa basal de células madre del epitelio (Egawa *et al.*, 2003; Burd *et al.*, 2003). Dos moléculas de la familia de las integrinas (L6X1 y L6X4) expresadas en la superficie de dichas células basales han sido identificadas como receptoras del HPV (Evander *et al.*, 1997) (Figura 15). Luego de establecida esta infección localizada, la misma puede seguir el curso de una infección latente o de una infección productiva (Figura 16).

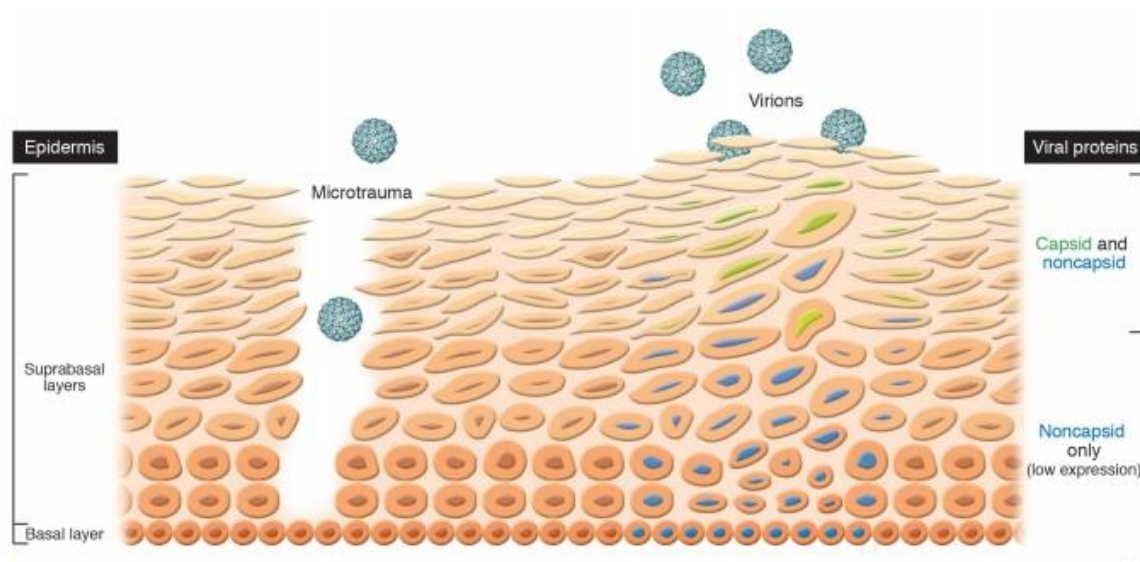


Figura 15. Ciclo de replicación del HPV. Tomado y Adaptado de Douglas & Schiller, 2006.

Infección Latente

Estrictamente se define como presencia de ADN viral en ausencia de producción de viriones; el virus puede ser detectado únicamente con técnicas de biología molecular estimándose que son portadores alrededor del 3,7% de los individuos asintomáticos (IARC, 2017).

Durante esta fase, la replicación del genoma viral es concomitante con la división de las células epiteliales y no interfiere con las funciones celulares; los estadios citológicos y colposcópicos del epitelio no presentan ninguna anomalía. La replicación se mantiene en un número bajo de copias (30-50 copias por célula infectada) asegurando

su distribución en las células basales. Se ha reportado una escasa activación de la respuesta inmune durante la infección latente (Stern *et al.*, 2005).

Infección Productiva

En esta etapa la replicación viral ocurre activamente en los estratos intermedio y superficial del epitelio de manera independiente a la síntesis del ADN cromosómico de la célula huésped y conduce a la producción de un elevado número de copias genómicas. Esta replicación viral, produce cambios cito-estructurales patognomónicos fácilmente detectables por las técnicas estándares citológicas, entre las que se destaca la tinción de Papanicolaou o Pap (Gomez Rueda *et al.*, 1996).

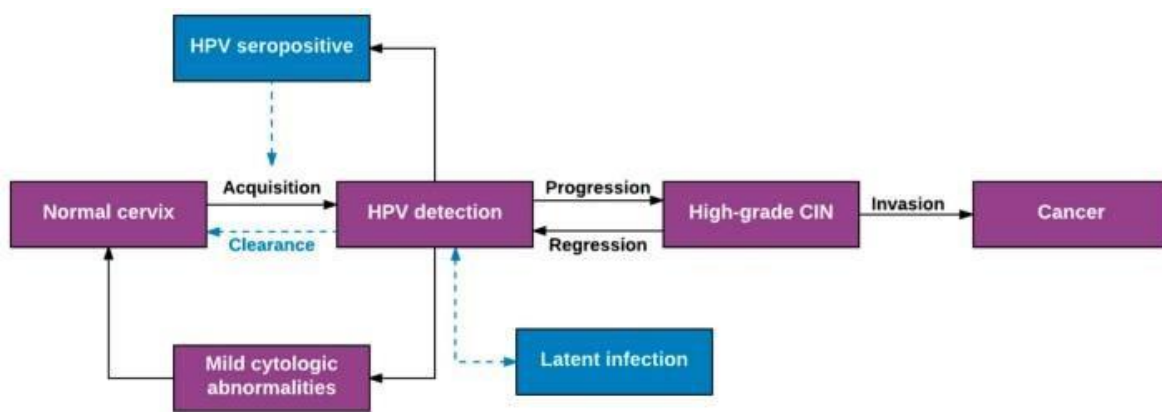


Figura 16. Modelo esquemático de la progresión en la infección por HPV. Tomado de Gravitt *et al.* 2017.

Epidemiología

Prevalencia de infección por HPV-16

De acuerdo con estudios de Meta-análisis las prevalencias de infección en mujeres asintomáticas con citología normal varían entre diferentes regiones geográficas del mundo, los valores más altos ocurren en Oceanía (8,3%), seguido de Sudamérica (5,4%), Europa (3,8%), África (3,7%) y los más bajos se reportan en Asia (3,4%) (IARC, 2017).

En Argentina, la prevalencia de infección por HPV-16 en mujeres con citología normal reportada por la IARC, 2017 es del 8,7 (IC95% 7,5-10,0), mayor a los valores establecidos para Sudamérica 5,4% ((IC95% 5,3-5,5) y el mundo 4,1% (IC95% 4,0-4,2). A pesar de estas diferencias, las prevalencias de infección por HPV-16 y 18 son similares en todas las regiones del mundo, con valores entre 3-6% para mujeres asintomáticas y de hasta un 50% para los casos de cáncer de cuello uterino.

Modelo de evolución viral

Al igual que en el caso del Poliomavirus JC, el HPV-16 ha sido empleado en estudios de evolución y antropología molecular. La alta prevalencia de este virus a nivel mundial, sumada a características propias de su genoma (baja tasa de mutación, ausencia de recombinación, entre otras) ha permitido caracterizar las variantes de HPV-16 asociándolas a una región geográfica en particular.

Durante más de dos décadas, los estudios de variabilidad genética del HPV-16 se han centrado en la secuenciación de fragmentos pequeños del genoma (gen L1, E6, E7 y la región no codificante LCR) (Yamada *et al.*, 1997). De acuerdo a la variación encontrada en estas regiones, el HPV-16 se clasifica en variantes europeas (A) y no europeas (B, C y D) (Burk *et al.*, 2013).

La distribución filogeográfica de estas variantes virales permite reconocer un linaje europeo (variantes A), africano (variantes B y C) y asiático-americano (variante D) (Figura 17). Estas variantes se habrían originado por mutación en el transcurso de los últimos 200.000 años, acompañando el proceso de evolución y migración de *Homo sapiens* fuera de África y se mantienen genéticamente estables en la actualidad (Chan *et al.*, 1992).

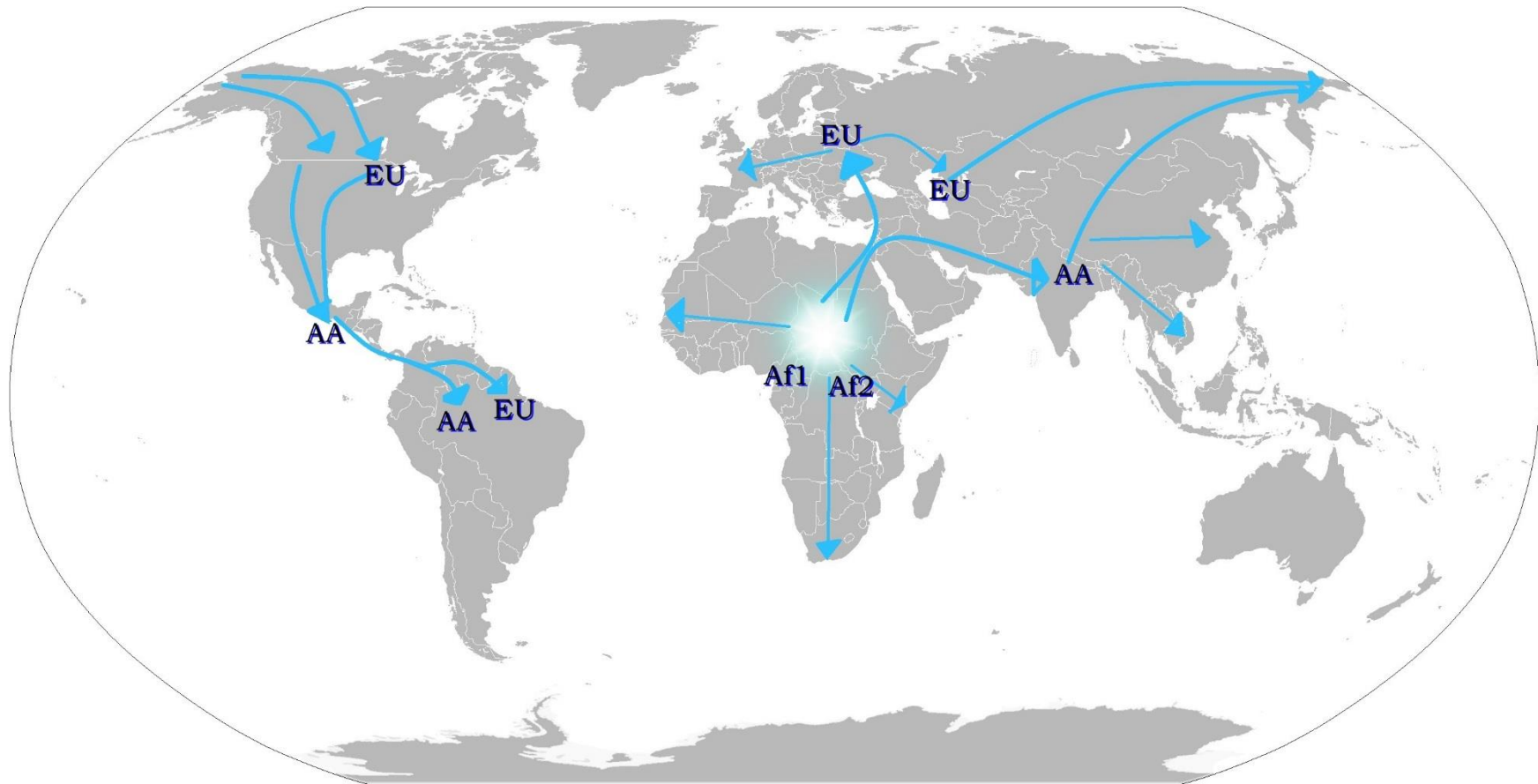


Figura 17. Migraciones humanas y distribución de variantes HPV-16. Adaptado de Ho *et al.*, 1993.

Antecedentes de estudios genéticos en HPV-16 en Argentina y Misiones

A nivel nacional existe un único estudio de variantes de HPV-16. En el mismo se analiza la relación filogenética de secuencias parciales del gen L1 (327pb) de muestras procedentes de la provincia de Buenos Aires (n=23), los resultados obtenidos por Chiesa y colaboradores (2016) arrojaron que el 89,5% de las secuencias eran de origen europeo, mientras que el 10,5% restante eran variantes de origen no-europeo.

Los estudios de variabilidad genética de HPV-16 sobre mujeres indígenas y mestizas residentes de la provincia de Misiones han indicado una alta frecuencia de variantes Europeas (aproximadamente el 90%), lo cual podría indicar una introducción del virus durante la inmigración Europea de fines del siglo XIX (Badano *et al.*, 2015).

Además la prevalencia en mujeres mestizas de Misiones generó un 49,8% de infección por HPV, mientras que el 19,5% de las mismas se encontraban infectadas por HPV-16, siendo el tipo viral más frecuente en la muestra poblacional (Badano *et al.*, 2018).

Objetivos



II-OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es proponer a partir del estudio de la evolución de los virus John Cunningham (JCV) y Virus Papiloma Humano (HPV) y de marcadores uniparentales humanos los posibles escenarios implicados en el poblamiento de la población de la Provincia de Misiones.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos planteados son:

1. Analizar la variación genética de la Región Control del ADN mitocondrial (región RHV-1) en individuos residentes de distintos puntos de la provincia de Misiones.
 1. a. Determinar el grado de mestizaje de la población analizada.
 1. b. Evaluar la existencia de estructura poblacional.
2. Analizar la variabilidad genética del gen L1 en muestras infectadas con HPV-16 y del gen VP1 en muestras infectadas con JCV.
 2. a. Estimar la edad del Ancestro Común Más Reciente (ACMR) y la dinámica de expansión poblacional para cada modelo viral.
3. Contextualizar los resultados obtenidos en el marco histórico del poblamiento de la Provincia.
4. Comparar los resultados obtenidos con aquellos disponibles a nivel nacional.

Materiales y Métodos



III- MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de muestras

Red de Provisión de Muestras, Tipos de muestra y consideraciones éticas

La obtención de muestras se realizó mediante muestreos a lo largo del territorio provincial. Las acciones de muestreo fueron coordinadas a través de consultorios e Institutos de salud de la Provincia. Brevemente, con el consentimiento del Director del Área, se informó acerca del proyecto a los profesionales a cargo. Con la aprobación y participación de estos profesionales se implementaron los muestreos en la consulta diaria. Sólo participaron personas residentes de la provincia de Misiones mayores de 18 años que firmaron un consentimiento informado (Anexo I).

Las muestras biológicas consistieron en hisopados de mucosa yugal y muestras de orina; ambas obtenidas por el propio participante del estudio (auto-toma). Los voluntarios fueron informados sobre las características de este estudio y aquellos que decidieron participar firmaron un consentimiento y completaron una ficha de carácter antropológico, la cual recabó datos sobre el lugar de nacimiento, residencia y apellidos hasta la generación de abuelos maternos y paternos de cada individuo (Anexo II).

Para la toma de muestra, los participantes fueron provistos de hisopos de algodón e instruidos para realizar un frotamiento vigoroso de la cara interna de la mejilla, a fin de obtener una muestra de células descamadas de la mucosa yugal. Los hisopos fueron posteriormente conservados a temperatura ambiente, en sobres de papel cerrados, hasta su traslado y procesamiento en el laboratorio. En el caso de las muestras destinadas a detección y caracterización de JCV, los participantes también recibieron un contenedor estéril para la colecta de orina. Estos contenedores fueron conservados a 4°C hasta su traslado al laboratorio.

Para los estudios de caracterización de HPV-16, se contó con una genoteca de ADN total obtenida a partir de cepillados cervicales perteneciente al LaBiMAp. Estas muestras fueron previamente obtenidas en el marco de proyectos epidemiológicos del grupo (FCEQyN-UNaM 16Q197, 16Q289, 16Q419 y 16Q540; ANPCyT PICT-R311/2).

La totalidad de muestras y fichas antropológicas recibieron un código y fueron derivadas para su procesamiento anonimizando la identidad de los participantes. Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Tanto el protocolo de muestreo como el uso de muestras biológicas almacenadas fue avalado por el Comité de Bioética del Departamento de Docencia e

Investigación del Hospital Dr. Ramón Madariaga en el marco del proyecto PICT-2012: "Estudios genéticos del poblamiento de Misiones a través de marcadores moleculares humanos y virales".

Puntos de Muestreo

Con el objetivo de obtener un panorama etno-geográfico de la provincia, los puntos de muestreo fueron definidos en función de su localización geográfica y los antecedentes históricos de poblamiento. Bajo este criterio, se muestrearon 4 localidades, abarcando las zonas Norte, Centro y Sur de Misiones. Las mismas se indican en el mapa de muestreo (Figura 18) y sus principales características se describen a continuación:

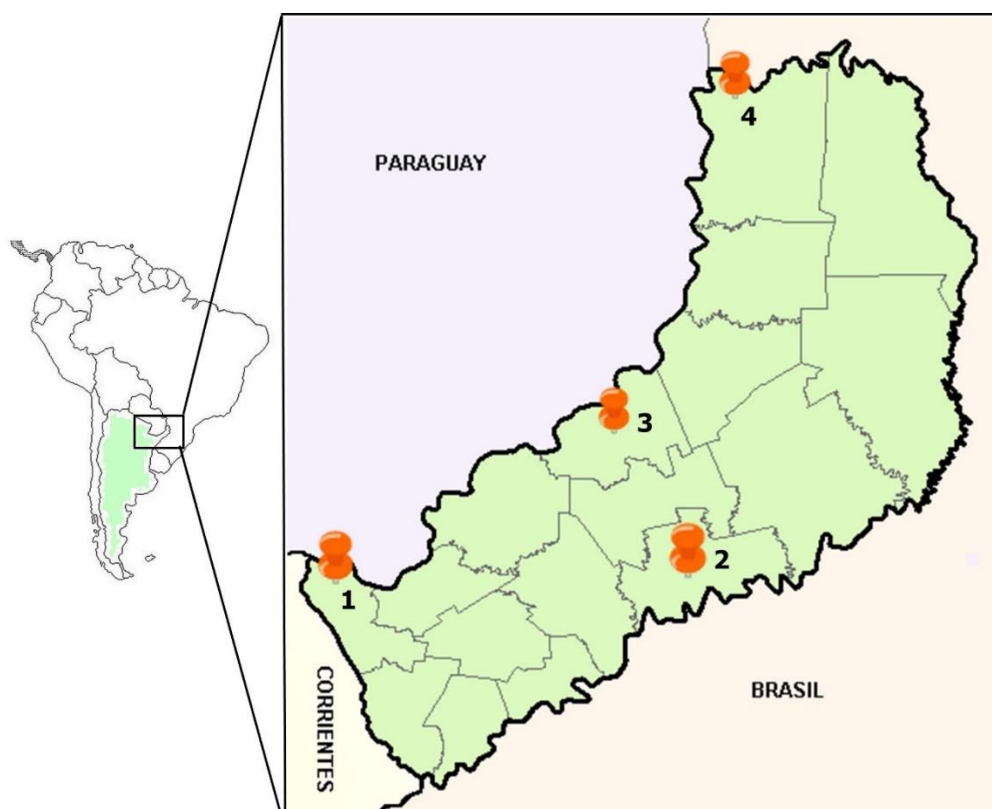


Figura 18. Localización geográfica de los puntos de muestreo dentro de la provincia de Misiones. Región Sur (1) Posadas; Región Centro (2) 25 de Mayo y (3) Ruiz de Montoya; Región Norte (4) Iguazú.

Región Sur

Las actividades de muestreo se llevaron a cabo en la ciudad de Posadas, capital de la provincia. La misma se ubica sobre el margen izquierdo del río Paraná, al sudoeste de la provincia ($27^{\circ}21'59''S$ $55^{\circ}53'39''O$). Según el censo del 2010 tiene una población 277.564 de habitantes. Al igual que un gran número de poblados de Misiones, éste fue conformado mayoritariamente por descendientes de inmigrantes. Su origen étnico europeo llegó a través de la República Federativa del Brasil, fundamentalmente por

medio de familias de italianos, alemanes, polacos y ucranianos. Sin embargo, la inmigración paraguaya fue la más significativa de todas, la cual dejó marcas indelebles en la cultura de la actual ciudad (Figura 19).



Figura 19. Vista aérea de la ciudad de Posadas donde se observa el puente internacional Roque González de Santa Cruz, el cual une la ciudad con territorio paraguayo.

Región Centro

Los muestreos se realizaron en dos localidades diferentes, Ruiz de Montoya y 25 de Mayo.

Ruiz de Montoya se ubica a 120 km de la ciudad de Posadas ($26^{\circ}59'05''$ S y $55^{\circ}02'56''$ O) y a 25 km del margen izquierdo del Río Paraná. Su población asciende a 3.635 habitantes. El poblamiento efectivo de la región comenzó en 1920, siendo sus protagonistas inmigrantes alemanes, alemanes-brasileños y suizos (Figura 20).

La ciudad de 25 de Mayo se ubica en la región centro-este de la provincia, a 175 km de la ciudad de Posadas y a 20 km del Río Uruguay, el cual representa el límite fronterizo con Brasil. Posee una población de 3.838 habitantes (INDEC, 2010). El poblamiento de esta región está asociado a colonos alemanes-brasileros principalmente que llegaron a la región desde Río Grande do Sul (Brasil), como así también a migrantes fronterizos de Brasil y posteriormente a migrantes de Paraguay que se asentaron en la región para dedicarse a la industria del tabaco.



Figura 20. Centro Suizo, ubicado en el municipio de Ruiz de Montoya.

Región Norte

Las acciones de nuestro se llevaron a cabo en la ciudad de Puerto Iguazú. La misma está ubicada en la confluencia de los Ríos Paraná e Iguazú ($25^{\circ}36'39''S$ y $54^{\circ}34'49''O$) a 310 km de la ciudad de Posadas y posee frontera con la ciudad de Foz de Iguazú (Brasil) con la cual se encuentra unida físicamente a través del puente Tancredo Neves y con el municipio de Ciudad del Este (Paraguay) (Figura 21). Actualmente su población asciende a 41.062 habitantes (INDEC, 2010).



Figura 21. Parte de la costanera iguazucense frente a las tres fronteras: a la derecha Paraguay, a la izquierda Brasil, y en primer plano, Argentina. Imagen tomada del Gran Atlas de Misiones.

Su población es producto del mestizaje de indígenas guaraníes, migrantes fronterizos como así también de colonos europeos, principalmente alemanes y polacos, que arribaron a la región a través de la "Compañía Colonizadora del Norte" (Gallero & Krautstolf, 2010).

Muestra analizada

En función del protocolo previamente descrito se realizaron 6 campañas de muestreo con una duración promedio de 3 días cada una. En total, se obtuvieron muestras de 364 individuos (200 en la zona Sur, 117 en el Centro y 47 en el Norte).

Por otra parte, el número de muestras biológicas colectadas fue mayor dado que en algunos casos se obtuvieron varias muestras por individuo (por ejemplo: orina e hisopado bucal). En este sentido, el muestreo total estuvo constituido por 592 muestras biológicas, incluyendo 164 hisopados de mucosa yugal para estudios genéticos humanos, 98 muestras de orina para estudios de detección y caracterización de JCV y genoma total correspondiente a 310 cepillados cervicales para detección y caracterización de HPV-16. Además de los hisopados de mucosa yugal, todas las muestras resultaron aptas para determinar el ADNmt del individuo.

2. Análisis moleculares

Extracción de ADN total

El ADN genómico total fue extraído mediante uso de Kits comerciales (ADN PuriPrep-S Kit-K1205-HighWay Biología Molecular. INBIO). Las muestras fueron cuantificadas mediante el Fluorómetro Qubit (Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit).

De acuerdo con el origen de la muestra biológica, se realizaron distintos protocolos previos al uso del kit comercial. Brevemente, se detallan a continuación:

-muestras de orina: a partir del frasco estéril provisto por cada individuo participante del estudio, se trasvasaron 2 ml de orina a un tubo eppendorf esterilizado. Posteriormente se realizó una primera centrifugación a 12.000g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante conservándose el pellet en el tubo. Luego se incorporaron 300ul de PBS 1X a cada tubo y se realizó nuevamente una centrifugación a 12.000g por 5 minutos. Finalmente se descartó el PBS y los pellets fueron utilizados en el primer paso del protocolo comercial.

-muestras de hisopado bucal: cada hisopo de algodón se colocó dentro de un tubo eppendorf de 2ml conteniendo 300ul de PBS 1X, cada uno fue agitado vigorosamente dentro del tubo y posteriormente el tubo fue centrifugado a 12.000g x 5 minutos. Producto de la centrifugación se obtuvo un sobrenadante que fue descartado y el pellet de cada tubo fue utilizado en el primer paso del protocolo comercial.

3. Análisis de los marcadores genéticos

3.1 ADN mitocondrial

La RHV-1 fue amplificada con los *primers* de coordenadas 15977-F (5'-CCA CCA TTA GCA CCC AAA GC-3') y 16552-R (5'-TAA GGG GAACGT GTG GGC-3') que generan un fragmento de 575 pb de acuerdo con el protocolo de Badano (2018) (Anexo III). Los productos obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa al 2% teñidos con *SYBR® Safe* y visualizados con *Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator* (470nm). Aquellas muestras positivas se secuenciaron con los *primers* originales mediante el sistema de ddNTPs terminadores de cadena mediante servicios a terceros (Macrogen Inc, Korea).

La asignación del haplogrupo mitocondrial se realizó siguiendo la nomenclatura más reciente de *PhyloTree* (van Oven M y Kayser M., 2009), a través del uso de dos herramientas online:

-*Haplogrep* (disponible en <http://haplogrep.uibk.ac.at/>)

-*Blast* (disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.2 Detección y caracterización de JCV

Se amplificaron 2 fragmentos del genoma viral: la región VP1/VP2 de 325 pb mediante una PCR anidada según el protocolo descrito por Torres *et al.* (2016) (Anexo III). Aquellas muestras positivas en la segunda ronda de PCR fueron reveladas en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio. Esta primera amplificación de las 98 muestras analizadas generó un 56,12% de muestras positivas para la infección por JCV.

El segundo fragmento del genoma viral analizado fue el gen VP1 de 1200 pb aproximadamente, mediante PCR anidada según las condiciones descritas por Torres *et al.* (2016) (Anexo III). Las muestras positivas en la segunda ronda de PCR fueron reveladas en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio.

Aquellas muestras positivas fueron sometidas a secuenciación automática con sus *primers* originales mediante el sistema de ddNTPs terminadores de cadena mediante servicios a terceros (Macrogen Inc, Korea), permitiendo la identificación de los principales tipos y subtipos asociados a poblaciones humanas.

3.3 Detección y caracterización de HPV-16

Se amplificó el gen L1 completo (proteína mayor de la cápside) de 1500 pb con los *primers* y las condiciones de PCR descritas por Totaro *et al.* (2013) (Anexo III). Las variantes fueron clasificadas de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Burk *et al.* (2013) como: Linaje A (previamente denominado Europeo), Linaje B y C (Africanas 1 y 2) y D (Asiática-americana), y sus respectivos sublinajes (A1, A2, A3, C, B1, B2, D1, D2, D3).

Las muestras positivas fueron sometidas a secuenciación automática con sus *primers* originales mediante el sistema de ddNTPs terminadores de cadena mediante servicios a terceros (Macrogen Inc, Korea).

La clasificación de las variantes previamente descritas y sus correspondientes sublinajes (A1, A2, A3, A4, B1, B2, C, D1, D2, D3) se realizó a través de la herramienta Blast del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

De los 310 cepillados cervicales, 106 muestras fueron identificadas como positivas para HPV y sometidas al protocolo de caracterización genética mediante la secuenciación de L1.

4. Análisis Bioinformático

4.1 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas a partir de los 3 marcadores en estudio fueron alineadas con el programa *Codon Code Aligner*[™] (Versión 2.0.6 – Licencia LaBiMAp-FCEQyN-UNaM).

Dado que los análisis filogenéticos y de coalescencia requieren de la utilización de modelos para describir el proceso de sustitución de nucleótidos, se determinó el modelo evolutivo que mejor se ajuste a cada *set* de datos con el programa *jModeltest v2.1* de acuerdo con el Criterio de Información de Akaike (Akaike, 1974; Darriba *et al.*, 2012).

4.2 Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas de las secuencias humanas y virales fueron construidas usando el método de *Maximum Likelihood (ML)* y *Neighbor Joining (NJ)* empleando el programa *MEGA 7* (Kumar *et al.*, 2016). En todos los casos, se evaluó el soporte de los agrupamientos filogenéticos mediante análisis de remuestreo (1000 pseudoréplicas de *bootstrap*) y sólo se consideraron los grupos con un valor de soporte mayor a 70%.

4.3 Análisis de Coalescencia

4.3.1 Datación del ancestro común más reciente y estimación de la dinámica poblacional

La datación molecular del Ancestro Común Más Reciente de las secuencias humanas y virales (*Dating of Most Recent Common Ancestor (tMRCA)*) se realizó mediante análisis de Coalescencia (*Monte Carlo Markov Chains (MCMC) Bayesian coalescent analysis*).

Los *sets* de datos se analizaron por separado bajo el modelo de reloj molecular lognormal no correlacionado (*UCLN, uncorrelated lognormal*), y modelos demográficos: tamaño poblacional constante y *Skyline (Bayesian Skyline)* implementados en el paquete de programas *BEAST v1.8.2* (Drummond and Rambaut, 2007; Drummond *et al.*, 2005; Minin *et al.*, 2008).

El muestreo de la distribución posterior de los parámetros, obtenido por el método de cadenas de Markov de Montecarlo, se extendió por el número de generaciones necesario para alcanzar la convergencia. Se utilizó el programa *Tracer v1.7* para visualizar los resultados. El criterio de convergencia en la fase estacionaria se basó en la obtención de valores de ESS (*effective sample sizes*) mayores a 200 y el mezclado aceptable de las cadenas para todos los parámetros estimados, después de descartar el

10 % del muestreo como *burn-in*. La incertidumbre en los parámetros estimados fue evaluada en el intervalo más corto que contiene al 95 % de la probabilidad posterior (HPD95%, *highest posterior density* 95 %).

Finalmente, se obtuvo el árbol de máxima credibilidad de clados (MCCT, *Maximum clade credibility tree*) con el programa *TreeAnnotator v1.8.2* aplicando el algoritmo de "*common ancestor heights*" (Heled & Bouckaert, 2013). La visualización se realizó con el programa *FigTree v1.4.2* (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4.4 Análisis de Redes (Network)

Los patrones demográficos y de flujo génico a nivel poblacional (humano y viral) fueron visualizados mediante estudios de Redes, según el modelo de máxima parsimonia mediante el software *NETWORK* versión 5 (Bandelt *et al.*, 1999; Forster *et al.*, 2001). El algoritmo utilizado fue "*Median joining*" para los 3 marcadores.

5. Análisis estadístico de Estructura Poblacional

La estructura genética poblacional de la provincia de Misiones se determinó utilizando los datos provistos por el marcador genético uniparental en estudio (ADNmt) mediante el cálculo del estadístico F_{st} o Índice de Fijación (Wright, 1931). Este índice tiene un mínimo teórico de 0 (indicando que no existe estructura genética) y un máximo de 1 (indicando fijación de alelos alternativos en diferentes subpoblaciones); sin embargo, en poblaciones naturales el máximo observado es usualmente mucho menor que 1. En 1987, Wright sugirió la siguiente interpretación cualitativa para valores de F_{st} :

Rango	Interpretación
0-0.05	Baja diferenciación genética
0.05-0.15	Moderada diferenciación genética
0.15-0.25	Alta diferenciación genética
>0.25	Muy alta diferenciación genética

El cálculo de estructura poblacional se realizará a partir de un análisis de AMOVA mediante el uso del software Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010).

Resultados



IV-RESULTADOS

1. Población de análisis:

Se analizaron un total de 364 individuos. El rango etario fue de 18-80 años (media de 39 años, moda de 30 años y mediana de 36 años). Las principales características de la población analizada se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características socio-demográficas de la población objeto de estudio.

		SUR¹ n 200	CENTRO n 117	NORTE n 47	TOTAL N 364
Composición por sexo^a	Mujeres	172 (86%)	77 (65,81%)	29 (61,70%)	278 (76,37%)
	Hombres	28 (14%)	40 (34,18%)	18 (38,30%)	86 (23,63%)
Edad	Rango	19-70	18-80	18-75	18-80
	Media	36	45	37	39
	Mediana	35	44	36	36
	Moda	30	28	33	30
Lugar de Nacimiento	Argentina	194 (97%)	107 (91,45%)	42 (89,36%)	343 (94,23%)
	Paraguay	6 (3%)	2 (1,71%)	2 (4,26%)	10 (2,75%)
	Brasil	-	8 (6,84%)	-	8 (2,20%)
	Otros	-	-	3 (6,38%)	3 (0,82%)
Lugar de nacimiento de la Abuela Materna (*)	Argentina		19 (35,19%)	27 (62,79%)	46 (47,42%)
	Paraguay		6 (11,11%)	6 (13,95%)	12 (12,37%)
	Brasil		23 (45,59%)	2 (4,65%)	25 (25,77%)
	Otros		-	3 (6,98%)	3 (3,09%)
	Subtotal América		48 (88,88%)	38 (88,37%)	86 (88,65%)
	España		-	3 (6,98%)	3 (3,09%)

	Italia	3 (5,55%)	1 (2,33%)	4 (4,12%)
	Alemania	-	-	-
	Otros	3 (5,55%)	1 (2,33%)	4 (4,12%)
	Subtotal Europa	6 (11,11%)	5 (11,63%)	11 (11,34%)
	Total	54 (100%)	43 (100%)	97 (100%)
	Argentina	15 (25,86%)	23 (56,10%)	38 (38,38%)
	Paraguay	8 (13,79%)	7 (17,07%)	15 (15,15%)
	Brasil	16 (27,59%)	1 (2,44%)	17 (17,17%)
	Otros	-	1 (2,44%)	1 (1,01%)
Lugar de nacimiento del Abuelo Paterno(**)	Subtotal América	39 (67,24%)	32 (78,05%)	71 (71,71%)
	España	1 (1,72%)	3 (7,32%)	4 (4,04%)
	Italia	2 (3,44%)	4 (9,76%)	6 (6,06%)
	Alemania	10 (17,24%)	-	10 (10,10%)
	Otros	6 (10,34%)	2 (4,88%)	8 (8,08%)
	Subtotal Europa	19 (32,76%)	9 (21,95%)	28 (28,28%)
	Total	58 (100%)	41 (100%)	99 (100%)

(*) Diferencia estadísticamente significativa ($X^2=23,11$; $gl=2$; $p<0,005$).

Se encontraron diferencias en el lugar de origen de las Abuelas Maternas y Abuelos Paternos de los participantes. Estas variables fueron elegidas por representar los sistemas de herencia matrilineal y patrilineal del individuo. En particular, el 28,3% de los Abuelos paternos habían nacido en Europa, mientras que solo el 11,3% de las Abuelas Maternas habían nacido en este continente. En la Figura 22 se muestra una foto familiar que fue proporcionada por un participante del estudio. En la misma se encuentra su padre (hijo de inmigrantes suizos) y la bisabuela, a quien describe como una mujer de "raíces indígenas" (mujer de la izquierda). La foto fue elegida para representar este proceso de miscegenación de la región previamente descrito.



Figura 22. Familia del centro de la provincia de Misiones.

2. Análisis de los marcadores genéticos

2.1 Análisis del ADN mitocondrial

Se analizaron 364 muestras de las cuales 32 resultaron negativas y fueron excluidas del análisis. Las restantes 285 muestras fueron sometidas a secuenciación automática, obteniéndose cromatogramas legibles en 270 de las mismas, por lo que este número constituye el tamaño muestral final de análisis para el ADN mitocondrial.

Se identificaron un total de 171 haplotipos (Anexo VI) los cuales fueron agrupados en 17 haplogrupos: A, B, C, D (de origen asiático-americano), europeos (H, HV, I, J, K, T, U, V, W, X) y africanos (L1, L2, L3). Su distribución y frecuencia por lugar de muestreo se detalla en la Tabla 2. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de estos haplogrupos por región geográfica. El aporte del componente asiático-americano, europeo y africano al acervo genético de la población total fue del 50,7%, 45,6% y 3,7% respectivamente.

Tabla 2. ADN mitocondrial presente en la provincia de Misiones

LINAJE	HAPLO GRUPO	REGIÓN						TOTAL POR HAPLOGRUPO
		SUR		CENTRO		NORTE		
		n	%	n	%	n	%	
ASIATICO-AMERICANO	A	29	17,36	8	10,52	3	11,11	40 (14,81%)
	B	14	8,38	10	13,16	4	14,81	28 (10,37%)
	C	38	22,75	10	13,16	4	14,81	52 (19,26%)
	D	13	7,78	2	2,63	2	7,41	17 (6,30%)
SubTotal Linaje Asiático Americano		94	56,3	30	39,5	13	48,1	137 (50,70%)
EUROPEO	H	31	18,56	23	30,26	4	14,81	58 (21,48%)
	HV	3	1,80	4	5,26	1	3,70	8 (2,96%)
	I	3	1,80	-	-	-	-	3 (1,11%)
	J	7	4,19	4	5,26	-	-	11 (4,07%)
	K	4	2,39	3	3,95	1	3,70	8 (2,96%)
	T	5	2,99	2	2,63	2	7,41	9 (3,33%)
	U	9	5,40	7	9,21	4	14,81	20 (7,40%)
	V	3	1,80	1	1,32	-	-	4 (1,48%)
	W	-	-	1	1,32	-	-	1 (0,37%)
	X	1	0,60	-	-	-	-	1 (0,37%)
SUBTOTAL LINAJE EUROPEO POR REGIÓN		66	39,5	45	59,2	12	44,4	123 (45,60%)
AFRICANO	L1	3	1,79	1	1,32	2	7,4	6 (2,22%)
	L2	2	1,20	-	-	-	-	2 (0,74%)
	L3	2	1,20	-	-	-	-	2 (0,74%)
SUBTOTAL LINAJE Africano POR REGIÓN		7	4,19	1	1,31	2	7,4	10 (3,7%)
Total		167	61,9	76	28,4	27	10	270 (100%)

2.1.2 Análisis estadístico de Estructura Poblacional

Para analizar la existencia de estructura poblacional en la muestra, se consideró a Misiones como una población compuesta por 3 subpoblaciones, correspondientes a la zona: "sur", "centro" y "norte" (según el lugar de muestreo correspondiente).

El valor de *Fst* obtenido en el análisis de AMOVA fue de 0,01166 y resultó estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (Tabla 3). De acuerdo con la propuesta de Wright, indica una baja diferenciación genética en la población.

Tabla 3. Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)

Fuente de variación	gl	SC	CM	% de variación
Entre poblaciones	2	12,779	0,04236 Va	1,17
Dentro de las poblaciones	256	918,904	3,58947 Vb	98,83
Total	258	931,683		
Índice de Fijación <i>Fst</i>		0,01166; p-value=0,0000		

SC Suma de cuadrados; CM componente de la varianza. Valor p (p-value) estimado en base a 1023 permutaciones.

2.2 Análisis del poliomavirus JC

Sobre 98 muestras de orina analizadas, 55 fueron positivas para la infección por JCV, indicando una prevalencia del 56,12%.

Las muestras positivas (n=55) fueron sometidas al protocolo de amplificación y secuenciación de VP1, obteniéndose cromatogramas legibles en 21 de las mismas (38.18%), por lo cual este número constituye el tamaño muestral final de análisis para el virus JC. La baja sensibilidad de la técnica podría atribuirse a la longitud del fragmento analizado (> 1000 bp) comparado con aquel empleado para la detección viral (VP1/VP2 < 500pb), y deberá ser considerado en futuros estudios.

Las 21 secuencias obtenidas fueron clasificadas mediante análisis filogenético por el método de *Neighbour Joining* y *Maximum Likelihood*, bajo el modelo de sustitución TN93 G+I, para ellos se utilizaron secuencias de referencia disponibles en Genbank (Anexo IV). El árbol obtenido a partir del método *ML* se muestra en la Figura 23, y el obtenido por *NJ* en el Anexo V. Ambos métodos permitieron resolver un árbol cuya topología general presentó 4 grupos monofiléticos correspondientes a los Tipos virales 1, 3, 4, 6. Por otra parte, los tipos 2 y 7 fueron polifiléticos. Esta situación no fue exclusiva del presente *dataset*, sino que ha sido previamente reportada en la bibliografía y apoya la necesidad de una revisión taxonómica del grupo (Cui *et al.*, 2004).

Con respecto a las secuencias de Misiones, el 47,62% agrupó con secuencias de referencia para el Tipo 2 (linaje asiático-americano), el 33,33% con secuencias de referencia para el Tipo 1 (linaje europeo) y el 19,05% restante con el Tipo 3 (linaje africano). Los detalles sobre la frecuencia de tipos y subtipos se muestran en la tabla 4.

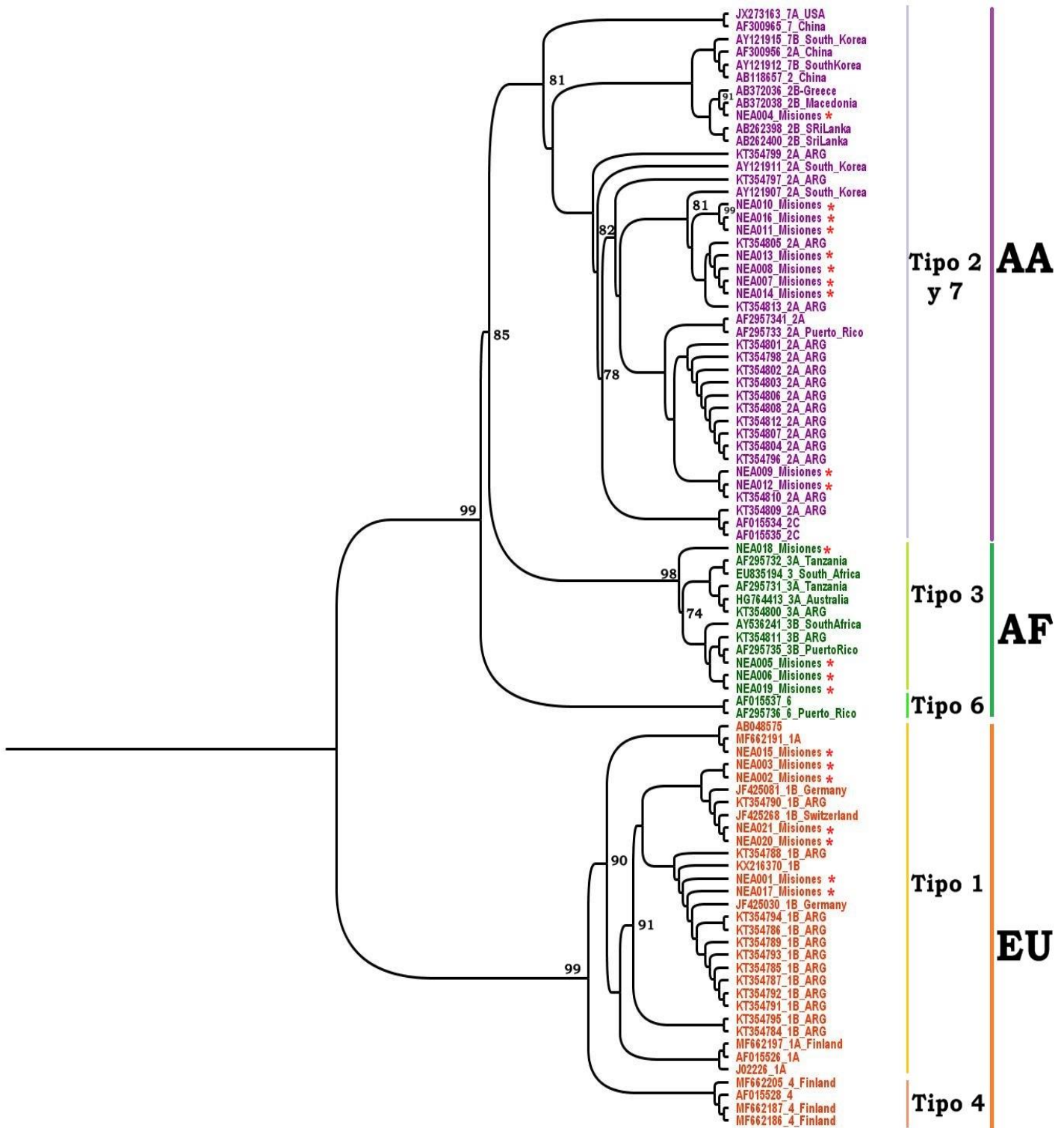


Figura 23. Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen VP1 del virus JC con secuencias de referencia publicadas en *Genbank*. Con un asterisco rojo se indican las secuencias de Misiones. EU: linaje europeo (naranja), AA: linaje asiático americano (violeta), AF: linaje africano (verde). Árbol generado por el método de *Maximun Likelihood (ML)* bajo el modelo de sustitución TN+93 G+I. En cada nodo se indican los valores de *bootstrap* superiores a 70.

Tabla 4. Tipos y Subtipos de JCV detectados en este estudio.

JCV	n	%	Origen (Hirsch, 2013)
Sub-tipo 1A	1	14,28	EUROPEO
Sub-tipo 1B	6	85,71	
Subtotal Tipo 1	7	33,33	
Sub-tipo 2A	9	90	ASIÁTICO-AMERICANO
Sub-tipo 2B	1	10	
Subtotal Tipo 2	10	47,62	
Sub-tipo 3B	4	100	AFRICANO
Subtotal Tipo 3	4	19,05	
Total	21	100	

2.3 Análisis del virus Papiloma Humano

Se analizaron 106 muestras positivas para HPV-16, de las cuales 12 no pudieron ser amplificadas (11,3%) y fueron excluidas del análisis. El resto de las muestras (n=94) fueron sometidas a secuenciación automática, obteniéndose cromatogramas legibles en 76 de las mismas (80%), por lo que este número constituye el número final de análisis.

Las relaciones evolutivas entre las 76 secuencias del gen L1 del HPV tipo 16 se analizaron por el método de *Neighbour Joining Maximum Likelihood*, bajo el modelo de sustitución TN93+I+G. El *dataset* de análisis estuvo conformado por las muestras de Misiones y secuencias de referencia disponibles en *Genbank* (Anexo IV). El árbol obtenido con el método *ML* se muestra en la Figura 24, y el obtenido por *NJ* en el Anexo V. Ambos métodos permitieron resolver un árbol cuya topología general permitió identificar 2 grupos monofiléticos principales correspondientes a los linajes A (europeos) y BCD (africanos y asiático-americanos), los cuales presentaron altos valores de soporte.

Con respecto a las secuencias de Misiones, el 94,74% agrupó con secuencias de referencia para el Linaje A (linajes europeos) y el 5,26% restante al Linaje D (linaje asiático-americano). Los detalles sobre la frecuencia de Linajes y Sublinajes determinados se muestran en la tabla 5. No se detectaron linajes de origen Africano en la muestra.

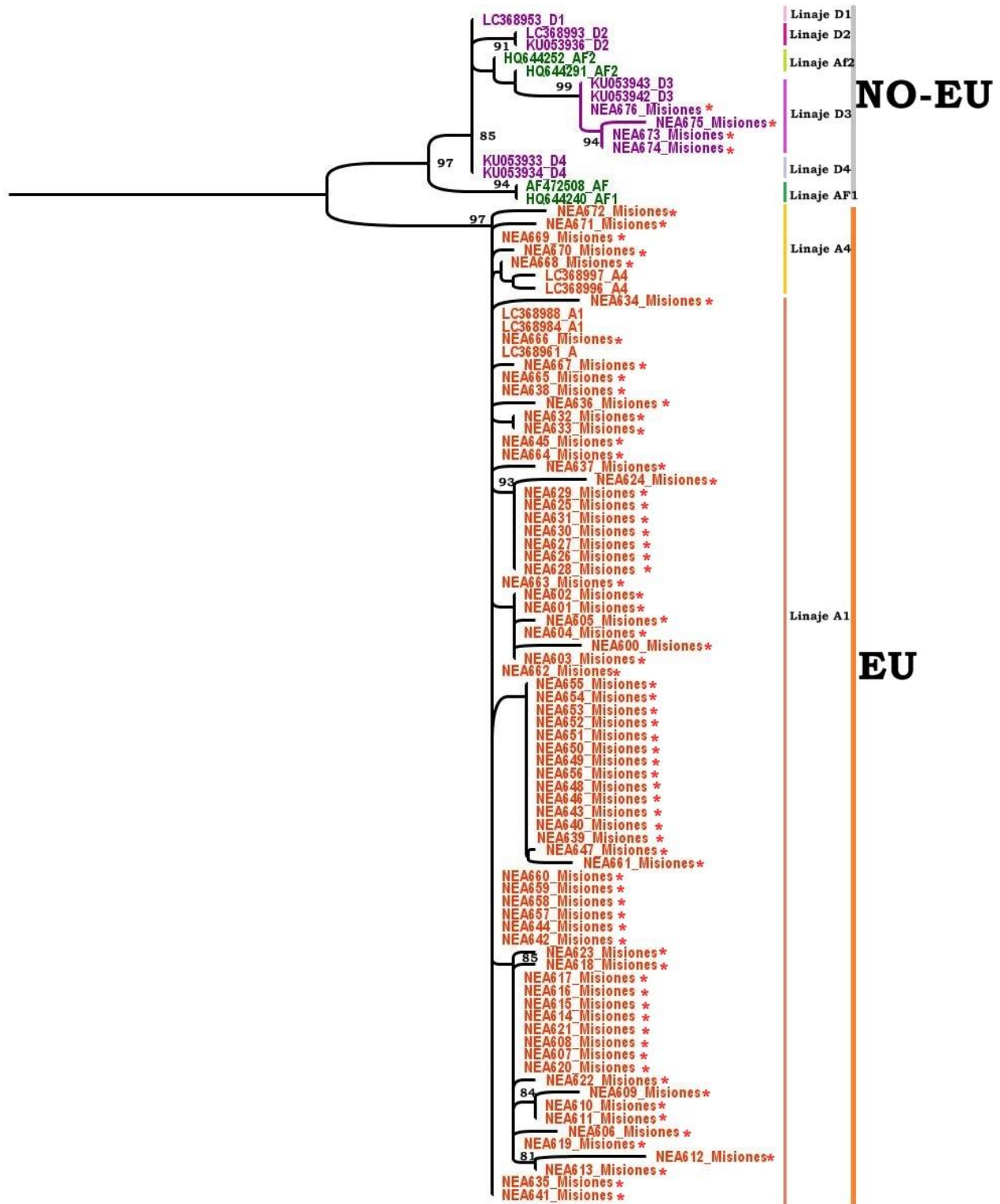


Figura 24. Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen L1 de HPV-16 de Misiones. Con un asterisco rojo se indican las secuencias de Misiones. EU: linaje europeo (naranja), NO-EU: linajes asiáticos americanos (violeta) y africanos (verde). Árbol generado por el método de Maximun Likelihood (ML) bajo el modelo de sustitución TN+93 G+I. En cada nodo se indican los valores de bootstrap superiores a 70.

Tabla 5. Linajes y sublinajes de HPV-16 determinados en este estudio.

	N	%	Origen
Linaje A			
A1	69	95,83%	Europeo
A4	3	4,16%	
Subtotal Linaje A	72	94,74%	
Linaje D			
D3	4	100%	Asiático- americano
Subtotal Linaje D	4	5,26%	
TOTAL	76	100%	

3.2 Análisis de Coalescencia

3.2.1 Datación del ancestro común más reciente y estimación de la dinámica poblacional

Virus JC

Se utilizaron métodos Bayesianos para estimar el tMRCA y la dinámica poblacional del virus JC, sus tipos y subtipos bajo los modelos *UCLN* y *Skyline*, con una tasa de sustitución de 4×10^{-7} s/s/a (Shackelton *et al.*, 2006). La edad del ACMR de todas las secuencias (raíz) fue estimada en 43.915 años [HPD 95%=11.738-514.907]. Las edades de los ancestros de los tipos que circulan en Misiones fueron: para el Tipo 1-europeo 14.549 años [HPD 95%=3.414-170.098], para el Tipo 3-africano 12.743 años [HPD 95%=1.882-143.535] y para el Tipo 2-asiático-americano 18.159 años [HPD 95%=5.167-222.218] (Figura 25 y Tabla 6).

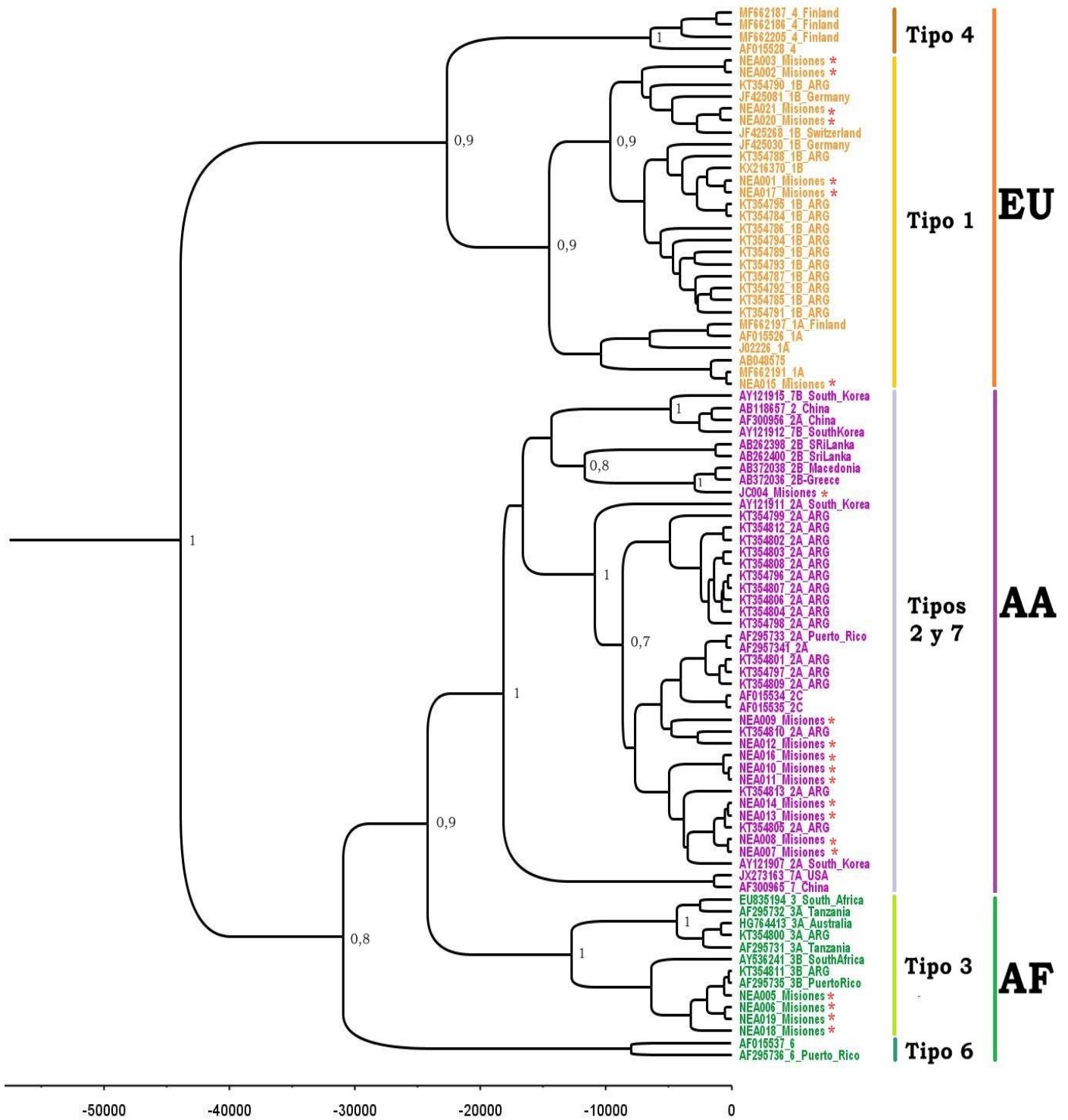


Figura 25. Árbol datado (MCCT) obtenido a partir de las secuencias del gen VP1 de JCV circulantes en Misiones

El análisis fue calibrado con una tasa de sustitución fija con una media en 4×10^{-7} s/s/a, bajo la combinación de modelos *UCLN-Constant size*. Los números en los nodos representan la probabilidad posterior de cada grupo. Las muestras de Misiones se identifican con un asterisco rojo.

Tabla 6. Estimación de edades de los ACMR de los Tipos virales de JC a nivel global

	Edad del ACMR	[HPD 95%]
Raíz del árbol	43.915	[11.738-514.907]
Linaje Africano	30.942	[8.101-362.120]
Africanas Tipo 3	12.743	[1.882-143.535]
Africanas Tipo 6	7.985	[782-91.126]
Linaje Asiático-americano (Tipos 2 y 7)	18.159	[5.167-222.218]
Linaje Europeo	22.663	[5.673-264.390]
Europeas Tipo 4	6.473	[430-72.231]
Europeas Tipo 1	14.549	[3.414-170.098]

Por otra parte, la dinámica poblacional viral, inferida a través del gráfico de BSK sugiere que el virus mantuvo un tamaño poblacional constante por miles de años desde el inicio de su historia evolutiva (43 mil años) hasta hace 5.000 años aproximadamente. Posterior a esta fecha, se produjo una gran expansión poblacional viral con un crecimiento constante hasta la actualidad (Figura 26).

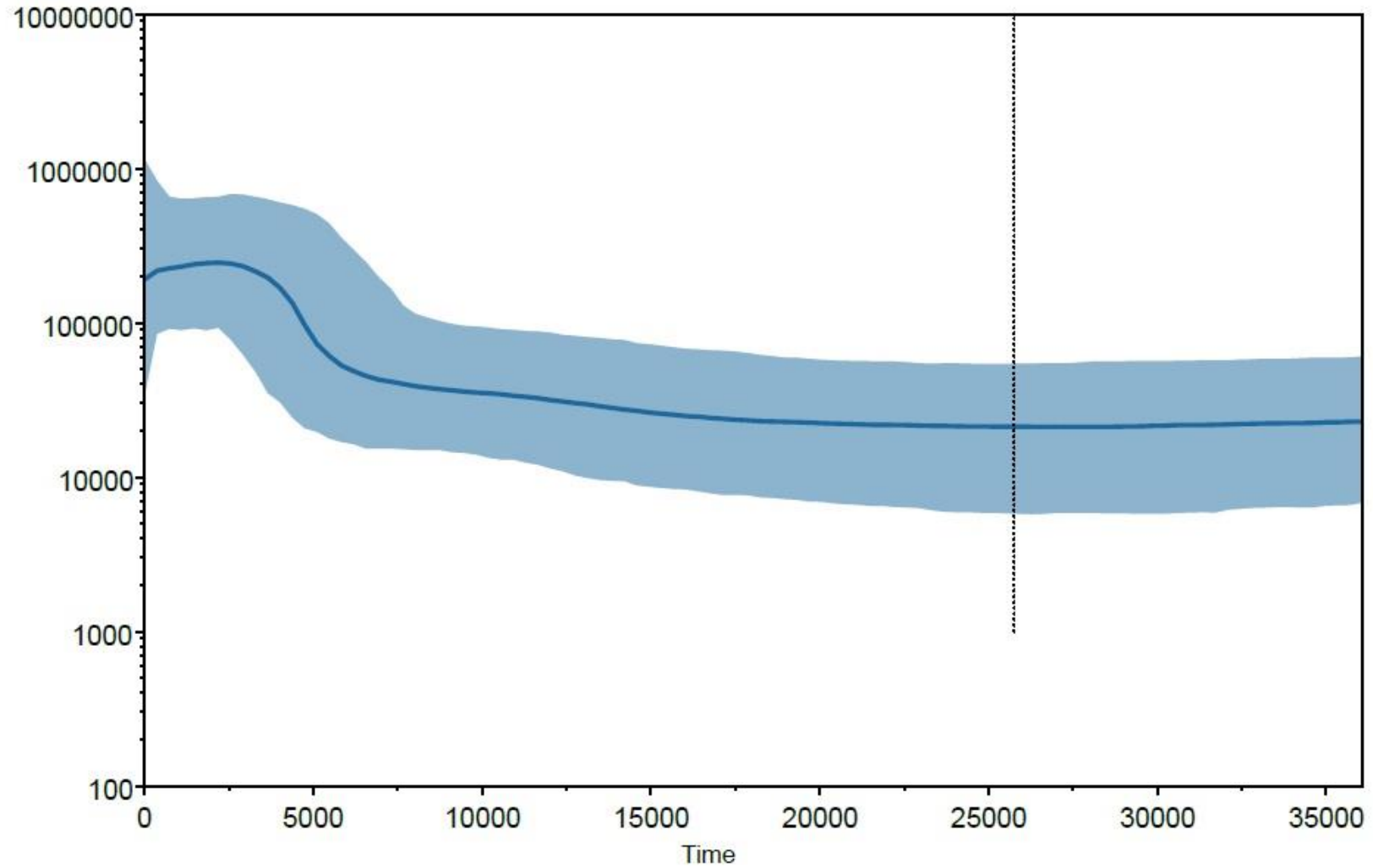


Figura 26. Reconstrucción demográfica del virus JCV a lo largo del tiempo

Se representa la media del número efectivo poblacional en función del tiempo obtenido del análisis de coalescencia de las secuencias calibrado con una tasa de sustitución con una media en 4×10^{-7} s/s/a, bajo la combinación de modelos *UCLN-Skyline*.

Virus HPV-16

Se llevó a cabo el análisis del *dataset* de 76 secuencias del gen L1 del virus HPV-16 provenientes de la provincia de Misiones bajo los modelos *UCLN* y *Skyline*, con una tasa de sustitución de 1×10^{-7} s/s/a (Badano *et al.*, 2015). Bajo estas hipótesis evolutivas, la edad del ACMR de todas las secuencias resultó ser de 69.783 años [HPD 95%=46.410-96.858]. La edad del ACMR del linaje europeo fue de 23.602 años [HPD 95%=13.749-38.126] y del linaje no europeo 29.778 años [HPD 95%=14.191-48264]. El linaje No Europeo mostró el ancestro común más antiguo, mientras que el asiático-americano constituye el clado más reciente con un ACMR datado hace 14.755 años [HPD 95%=6.215-26.642] (Figura 27 y tabla 7).

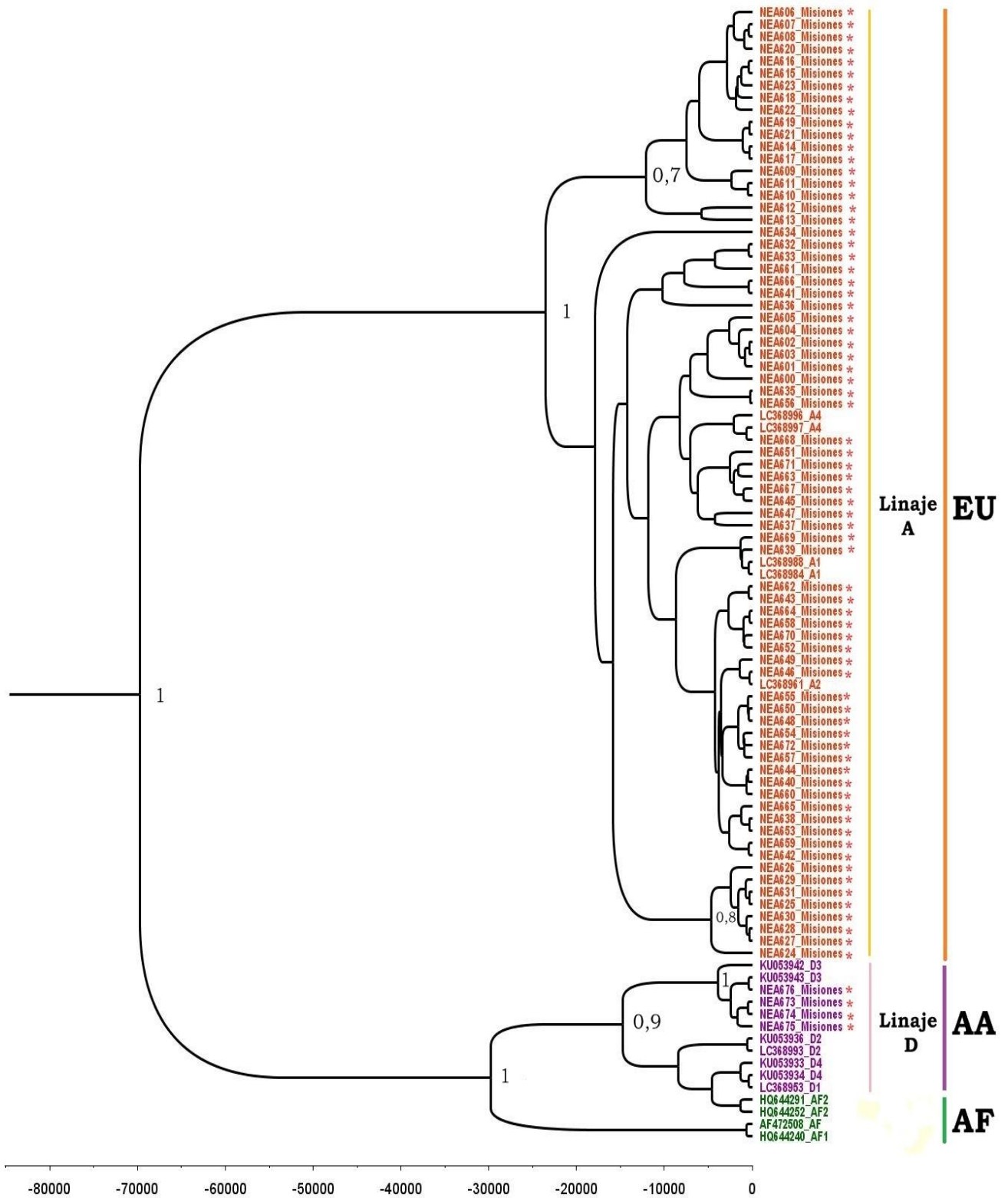


Figura 27. Árbol datado (MCCT) obtenido a partir de las secuencias del gen L1 de HPV-16 circulantes en Misiones

El análisis fue calibrado con una tasa de sustitución fija con una media en 1×10^{-7} s/s/a, bajo la combinación de modelos *UCLN-Constant size*. Los números en los nodos representan la probabilidad posterior de los principales grupos. Las muestras de Misiones se identifican con un asterisco rojo.

Tabla 7. Estimación de Edades de los ACMR de las secuencias de HPV-16 a nivel global

	Edad del MRCAa	[HPD 95%]
Raíz del MCCT	69.783	[46.410-96.858]
Linaje No Europeo	29.778	[14.191-48.264]
Linaje Asiático- americano	14.755	[6.215-26.642]
Linaje Europeo	23.602	[13.749-38.126]

La reconstrucción demográfica (Figura 28) sugiere que el virus HPV-16 mantuvo un tamaño poblacional constante por miles de años desde el inicio de su historia evolutiva. Luego, hace menos de 10.000 años se produjo una gran expansión, que se observa como un aumento de diversidad como indicio del aumento del tamaño de la población viral, y finalmente un crecimiento constante en los últimos años.

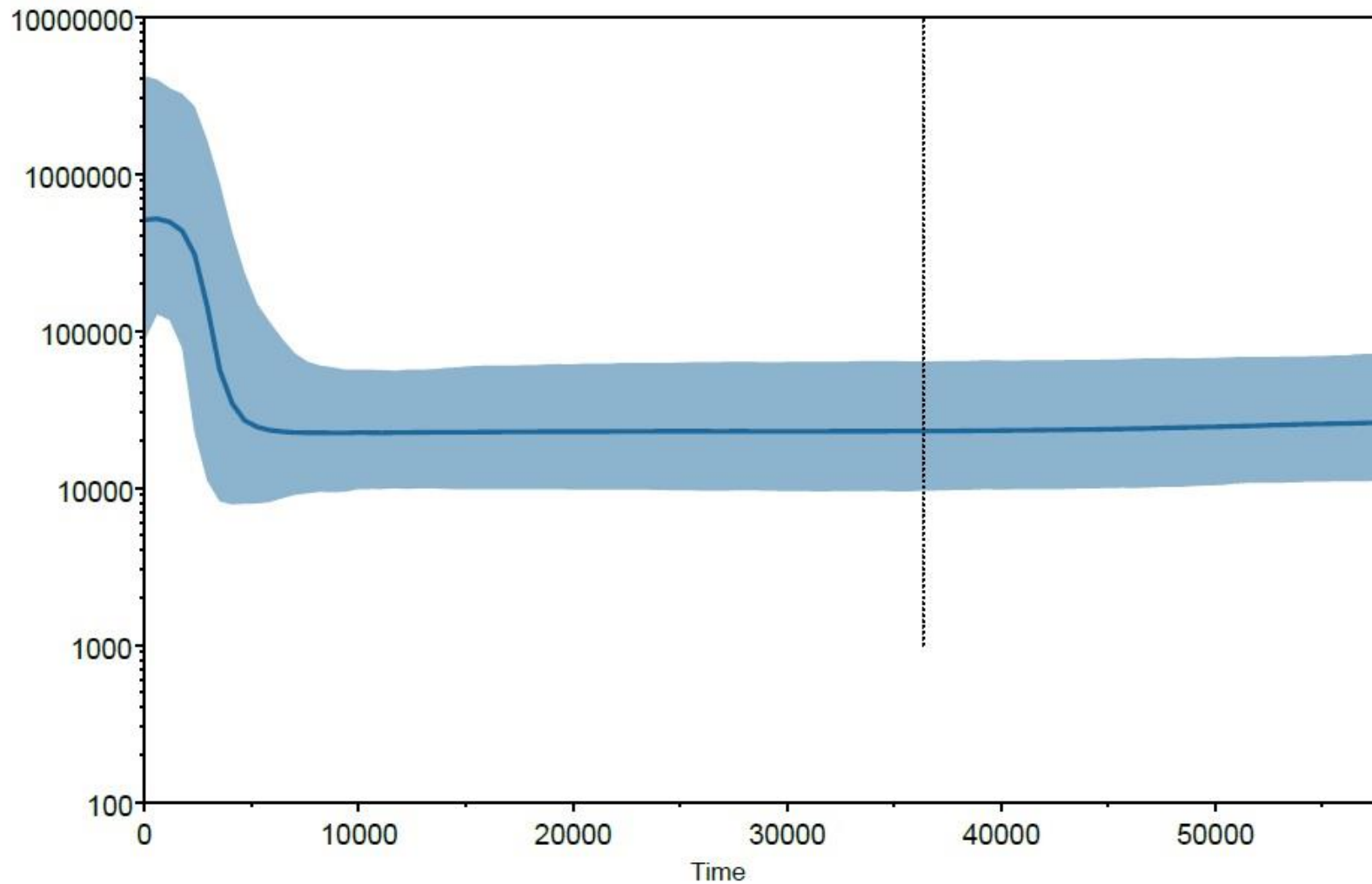


Figura 28. Reconstrucción demográfica del virus HPV-16 a lo largo del tiempo

Se representa la media del número efectivo poblacional en función del tiempo obtenido del análisis de coalescencia de las secuencias calibrado con una tasa de sustitución con una media en 1×10^{-7} s/s/a, bajo la combinación de modelos UCLN-Skyline.

3.3 Patrones demográficos. Análisis de Redes (network)

Los gráficos de Redes facilitan la visualización de eventos demográficos a nivel poblacional. A diferencia de los árboles filogenéticos, la red incorpora información sobre la frecuencia (diámetro de la esfera) y el origen (color) de los haplotipos en la población. Con el objetivo de comparar los patrones de red provistos por los 3 marcadores en estudio, la frecuencia haplotípica que se observa es porcentual.

ADN mitocondrial

El análisis de Network se muestra en la Figura 29. Se identificaron 171 haplotipos sobre 270 muestras analizadas, la diversidad haplotípica encontrada fue alta ($H_d=0,99$). La topología general de la red presentó 3 clusters mayores que corresponden a los 3 grandes linajes (asiático-americano, europeo y africano). Dentro de cada cluster es posible encontrar haplotipos que estarían mostrando un efecto fundador (haplotipo nodal en alta frecuencia con haplotipos derivados de él), por ejemplo los haplotipos del haplogrupo H en el cluster europeo y los haplotipos del haplogrupo C en el clúster asiático-americano. Además, la coexistencia de múltiples haplotipos en un mismo espacio geográfico, sería producto de la mezcla poblacional.

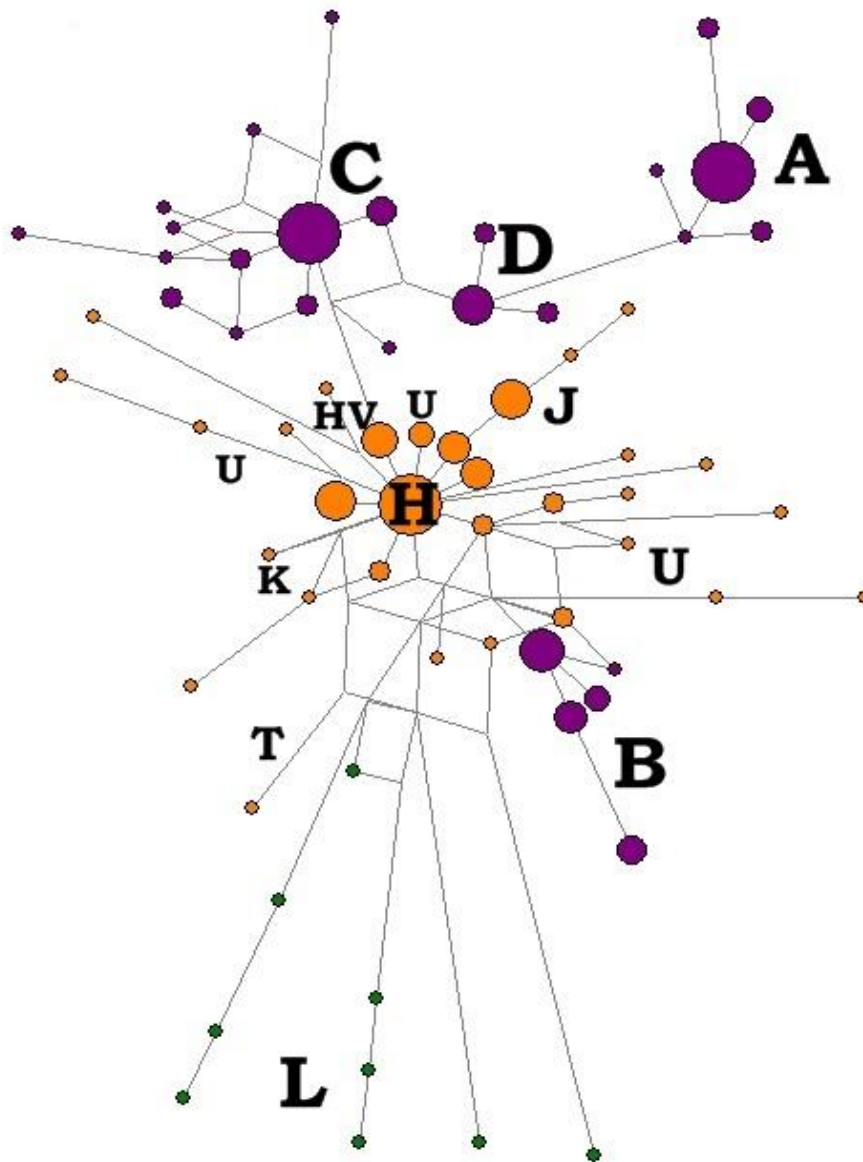


Figura 29: Análisis de Redes de haplotipos mitocondriais para la población de Misiones. El código de colores indica (i) violeta: haplotipos de origen amerindio, (ii) naranja: haplotipos de origen europeo, (iii) verde: haplotipos de origen africano. Los haplogrupos están indicados contiguos a los haplotipos correspondientes.

Virus JC

El análisis de redes se muestra en la figura 30. Se identificaron 13 haplotipos sobre 21 muestras analizadas, indicando una diversidad haplotípica alta ($H_d=0,98$). La topología general de la red presentó 3 *clusters* mayores correspondientes a los linajes asiático-americano, europeo y africano. Ningún *cluster* presentó señales de efecto fundador, expansión poblacional, ni cuello de botella. En este sentido, la coexistencia de múltiples haplotipos en un mismo espacio geográfico, sería producto de la mezcla poblacional de sus hospedadores humanos.

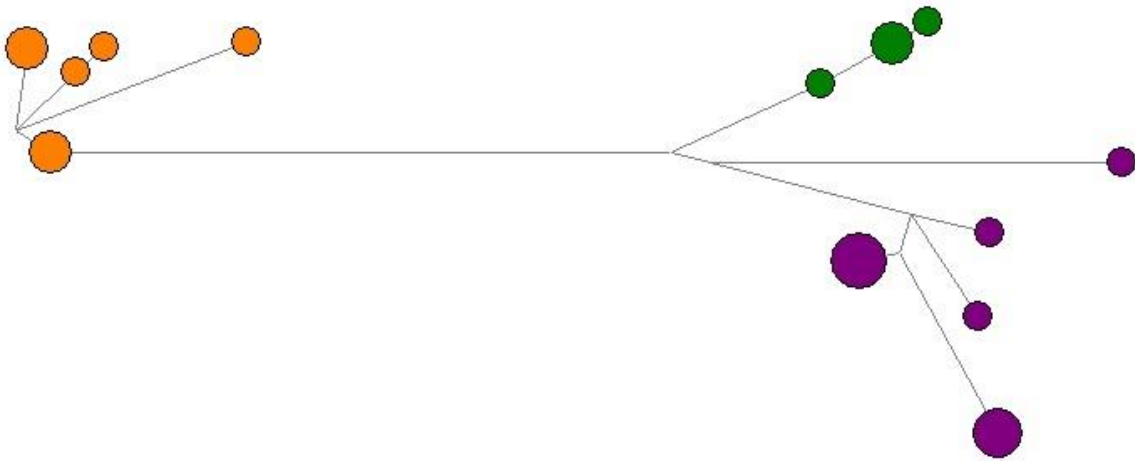


Figura 30. Análisis de redes para los tipos circulantes de JCV en Misiones mediante el método de Máxima Parsimonia. El código de colores indica: (i) naranja: tipos virales europeos, (ii) violeta: tipos virales amerindios, (iii) verde: tipos virales de origen africano.

Virus HPV

El análisis de redes se muestra en la figura 31. Se identificaron 25 haplotipos sobre 76 muestras analizadas, encontrándose una diversidad haplotípica inferior a los otros dos marcadores en estudio ($H_d=0,80$). La topología general de la red presentó 2 *clusters*, los cuales corresponden a los linajes asiático-americano y europeo. En los haplotipos de origen europeo se observan haplotipos nodales en alta frecuencia, y haplotipos derivados en baja frecuencia, lo que estaría indicando un efecto fundador de este linaje; en cambio, en los haplotipos de origen asiático-americanos no se distinguen haplotipos nodales, y los que se encuentran presentes, coexisten en baja frecuencia.

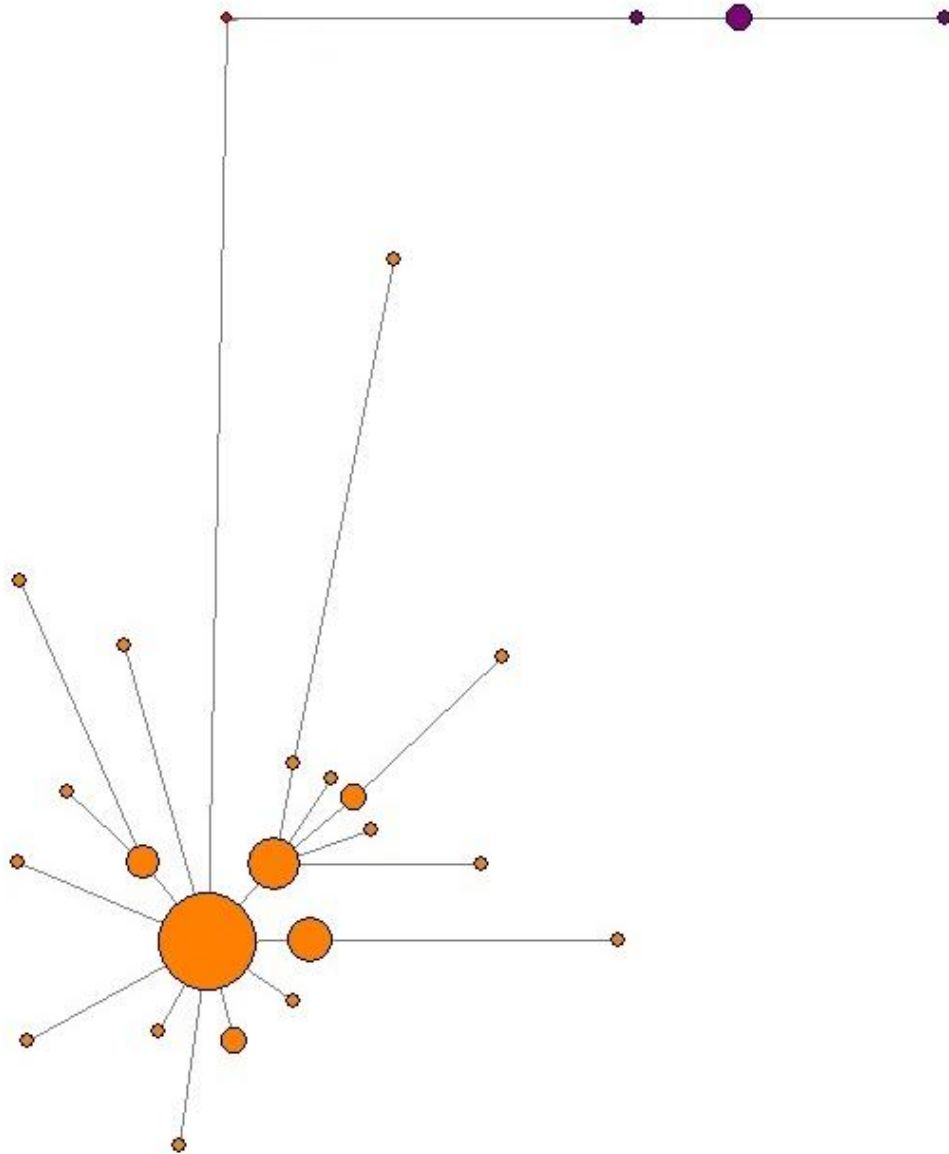


Figura 31. Análisis de redes para las variantes circulantes de HPV-16 en Misiones mediante el método de Máxima Parsimonia. El código de colores indica: (i) naranja: tipos virales europeos, (ii) violeta: tipos virales amerindios.

3.4 Resumen de resultados obtenidos por los tres marcadores en el marco histórico del poblamiento de la Provincia.

Los orígenes geográficos de los linajes de JCV, HPV y aquellos determinados por el ADNmt para la población de Misiones se muestran en la Tabla 8. Se encontraron diferencias significativas entre todos ellos. En particular, al ser comparados con el ADNmt las variantes de virus JCV presentaron los valores más altos de componente africano de la población, mientras que HPV-16 presentó los valores más altos para el componente europeo.

Tabla 8. Orígenes geográficos del ADNmt, virus JC y HPV de Misiones.

	ADNmt		JCV		HPV-16		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Europeo	123	45	7	33	72	95	202	55
Amerindio	137	51	10	48	4	5	151	41
Africano	10	4	4	19	0	0	14	4
TOTAL	270	100	21	100	76	100	367	100

Los resultados obtenidos permitieron asociar un posible escenario histórico, el cual sumado a las características propias de cada marcador (modo de transmisión viral), explicaría los patrones distintivos que se observan:

I-A través del análisis de las fichas antropológicas fue posible determinar que una importante fracción de la población es descendiente de brasileros, lo que explicaría en parte el alto componente africano encontrado en el virus JC. Además, el modo de transmisión horizontal de este virus, podría resultar más sensible a la hora de reflejar estos movimientos migratorios actuales.

II-El elevado componente europeo encontrado en el virus HPV-16 se asemeja a los valores reportados para el cromosoma Y en esta región (95,8% correspondiente al linaje europeo y 2,5% al linaje amerindio, según reporta Corach *et al.*, 2010), lo cual podría estar asociado al modo de transmisión de este virus, resultando ser más sensible a la hora de visibilizar el aporte de los hombres al acervo genético de la población. Además, los datos recabados a través de la ficha antropológica arrojan que el 28,28% de los participantes son descendientes de un abuelo europeo.

En su conjunto los tres marcadores resultaron ser complementarios a la hora de visibilizar los aportes de cada componente étnico al pool génico de la población de Misiones.

Discusión



V-DISCUSIÓN

La provincia de Misiones presenta un patrón demográfico único en la Argentina asociado a su historia y posición geográfica. El *pool* génico de su población actual es producto del aporte o miscegenación de varios grupos étnicos, cada uno de ellos vinculados a un proceso histórico de migración: (i) indígenas Guaraníes, quienes fueron los primeros pobladores del territorio (ii) migrantes europeos del período de la Conquista (Siglo XVI) y aquellos que arribaron producto de la colonización oficial y privada de la Argentina (Siglo XX) y (iii) migrantes fronterizos de Brasil, Paraguay y otras regiones de la Argentina. Además, otra particularidad es que, en la actualidad, estos grupos étnicos coexisten en el territorio; es posible encontrar comunidades Mbya Guaraní asociadas al remanente de selva de la provincia, comunidades de colonos, cuyos integrantes poseen una autodenominación étnica europea y población que se define como mestiza o criolla. De este modo, la provincia presenta una constitución multifacética la cual se ve reflejada en el pluralismo sociocultural de su población (Gallero & Krautstolf, 2010).

En este trabajo de Tesis se determinó el perfil genético de la población de Misiones a través de un marcador genético uniparental y dos marcadores moleculares virales; asimismo, representa el primer registro de Antropología Molecular en población mestiza de la Argentina que combine ambos tipos de marcadores genéticos en un mismo estudio. Los principales resultados se discuten a continuación:

CARACTERÍSTICAS SOCIOCULTURALES Y GENÉTICAS DE LAS POBLACIONES

Los muestreos se llevaron a cabo en distintos puntos de la provincia (Sur, Centro y Norte), lo que permitió obtener un mapa etno-geográfico de la región. La población final analizada fue de 270 individuos.

La caracterización genética del ADNmt de la población permitió definir un 50,74% de linajes de origen amerindios (A, B, C, D); 45,56% de origen europeos (H, HV, I, J, K, T, U, V,W,X) y 3,70% africanos (L1, L2, L3). Este perfil genético fue similar al previamente reportado para el NEA (70% linajes asiático-americanos, 29% linajes europeos y 1% linajes africanos) (Corach *et al.*, 2010; Catelli *et al.*, 2011) y para la media de Argentina (53% linajes asiático-americanos, 44,3% linajes europeos y 2,0% linajes africanos) (Martinez-Marignac *et al.*, 2004; Salas *et al.*, 2008), y presentó las siguientes particularidades:

-alta frecuencia de los haplogrupos A y C (29,2% y 37,9% respectivamente). El haplogrupo A se considera característico de los pueblos originarios Mbya-Guaraní,

mientras que el haplogrupo C no se asocia a población indígena de la región (Sala *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios recientes han descripto que el haplogrupo C presenta alta frecuencia en poblaciones mestizas de todo el país, incluyendo Misiones. (Badano *et al.*, 2018; García *et al.*, 2009).

Con respecto al origen del componente europeo, los haplogrupos H y U fueron los más frecuentes (47,1% y 16,3% respectivamente) en la población. En particular, la contribución de linajes europeos en la zona centro fue cercana al 60%, lo cual refleja el hecho histórico de su poblamiento por colonos de origen Suizo y Alemán (Gallero & Krautstolf, 2010). Al respecto, los datos recabados en la ficha antropológica reportaron que el 17,2% de participantes en el muestreo descendían de un Abuelo Paterno de origen alemán.

Finalmente, el origen del componente africano presente en la provincia de Misiones, podría ser atribuido a la proximidad geográfica con Brasil, donde la frecuencia de este linaje mitocondrial ronda entre el 14,7% al 50,8% (Muzzio *et al.*, 2018). En particular, en la región fronteriza de Río Grande do Sul, el aporte del linaje africano al acervo génico de la población es cercano al 35% (Guerreiro-Junior *et al.*, 2007). Es interesante destacar que los datos recabados en la ficha antropológica indicaron que entre el 20 y 25% de los participantes desciende de abuelos/as nacidos en Brasil.

Los análisis estadísticos de estructura poblacional arrojaron un valor de *Fst* de 0,0116 el cual fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$), indicando una baja estructuración genética de la población. Valores similares fueron reportados para la región central de Argentina (García *et al.*, 2018).

MARCADORES VIRALES

VIRUS JC

La prevalencia de infección por JCV fue del 56% y constituye el primer reporte epidemiológico para la región. Este valor se encuentra en el rango de lo establecido para otras poblaciones a nivel mundial: poblaciones urbanas en los EE. UU. (40%) (Agostini, Ryschewitsch & Stoner, 1996), en los países europeos (rango de 30-44%) (Agostini *et al.*, 2001; Ikegaya *et al.*, 2005), en la región amazónica de Brasil (16-77%) (Cayres-Vallinoto *et al.*, 2012), y es mayor que lo reportado para población urbana de Australia (29%) (Whiley *et al.*, 2001).

Con respecto a la caracterización genética viral, los análisis filogenéticos del gen VP1 permitieron determinar la circulación de 3 Tipos (1, 2, 3) y 5 subtipos (1A, 1B, 2A, 2B y 3B) para JCV. El origen geográfico de los mismos fue: 47,62% asiático-americano,

33,33% europeo y 19,05% africano. Estos valores fueron similares a los reportados para otra población de la Argentina, donde la frecuencia de linajes fue del 66-90% asiáticos-americanos, 33% europeos y del 10 al 15% africanos (el aporte de cada componente se ubica dentro de los rangos mencionados y varía según el origen de la muestra: pacientes infectados con VIH, aguas residuales o aguas de río) (Torres *et al.*, 2016).

Además, este patrón de tres componentes étnicos en JCV coincidió con el reportado para el ADNmt en la población de Misiones y se corresponde con el valor esperado en poblaciones mezcladas de Argentina. Sin embargo, la frecuencia de linajes africanos virales fue mayor a los linajes africanos arrojados por el ADNmt. Es posible que estos linajes hayan sido introducidos a través de inmigrantes provenientes de Brasil, dado que una importante fracción de la población declaró ser descendiente de Brasileños. Además, como dato histórico relevante, existe una importante comunidad de Alemanes-Brasileños que arribaron a la provincia y se establecieron en esta región (Gallero & Krautstolf, 2010). Resultados no publicados de nuestro grupo indicaron que los portadores de virus JC de origen africano poseen mitocondrias europeas, apoyando parcialmente esta hipótesis. Se propone que, por su tipo de herencia horizontal/intrafamiliar, el virus JCV habría resultado más sensible que el ADNmt para reflejar este proceso migratorio reciente en la región.

VIRUS HPV

El Virus Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16) es uno de los principales responsables del desarrollo de cáncer de cuello de útero (IARC, 2017). Este tipo viral se encuentra en el tracto genital del 3,6% de la población femenina asintomática, aproximadamente el 25% de las lesiones genitales de bajo grado y el 50% de los carcinomas a nivel mundial (WHO/ICO, 2017). Estadísticas regionales de nuestro grupo han establecido prevalencias tipo-específicas del 7% en la población asintomática, 30% en lesiones de Bajo grado y aprox. 50% en cánceres cervicales de ciudad de Posadas, similares a las de referencia mundial (Badano *et al.*, 2011; 2012).

En este estudio, la prevalencia de HPV-16 fue del 28,6%, y se corresponde con aquella descrita para mujeres con lesiones de bajo grado de la región.

Con respecto a la caracterización genética viral, los análisis filogenéticos del gen L1 permitieron determinar la circulación de 2 Linajes (A y D) y 3 sublinajes (A1, A4, D3). El origen geográfico de los mismos fue: 94,74% europeo y 5,26% asiático-americano. Estos resultados coinciden con lo previamente reportado para la provincia de Buenos Aires (91% Europeo y el 9% No-Europeas) (Chiesa *et al.*, 2016) y con lo reportado para la provincia de Misiones (92,1% Europeas y 6,9% Asiático-americanas) (Badano *et al.*, 2011)

y son notablemente similares a los reportes de ancestralidad para el cromosoma Y en la Argentina, donde el 94,1% de los linajes son de origen europeo mientras que un 4,9% corresponden al linaje Amerindio, y particularmente la región noreste presentó un 95,8% de linajes europeos para este marcador mientras que el 2,5% restante corresponde al linaje amerindio (Corach *et al.*, 2010). Sin embargo, contrastan marcadamente con el origen geográfico de 3 componentes descripto por el ADNmt y JCV.

Se propone que por ser una infección de transmisión sexual, el HPV-16 podría ser un marcador más sensible para visibilizar el aporte de los hombres a la dinámica del proceso migratorio implicado en el poblamiento de la región. En este contexto, el patrón de HPV-16 podría interpretarse como una fuerte irrupción del virus durante la colonización española del siglo XVI y/o la inmigración europea del siglo XX en la región.

Así, la discrepancia entre el origen geográfico de los marcadores virales podría estar relacionado con el proceso de contribuciones asimétricas (*directional mating*) descripto para el ADNmt y el cromosoma Y, que ocurre en las poblaciones de Argentina (donde la dirección del proceso de mestizaje ha involucrado una importante aporte de hombres de origen Europeo y mujeres nativo americanas) (Salas *et al.*, 2008).

Si bien la presencia de contribuciones direccionales en nuestra población no puede ser confirmada por nuestros datos, debido a la naturaleza del marcador uniparental (herencia materna); el registro antropológico indicó que el 80% de los descendientes de europeos participantes en este estudio heredó la etnicidad por línea paterna y el 20% por la línea materna, aportando datos en esta dirección. Futuros estudios de variación en marcadores del cromosoma Y, serán necesarios para brindar soporte adicional a esta hipótesis.

DATACIÓN MOLECULAR Y EXPANSIÓN POBLACIONAL DE CADA MODELO VIRAL:

La datación molecular de nuestras secuencias junto al análisis de reconstrucción demográfica estimó que los eventos de expansión poblacional en ambos marcadores virales son ancestrales y ocurrieron previos al proceso histórico del poblamiento de la provincia. Brevemente, el Ancestro Común para todas las secuencias de JCV analizadas fue de 43.915 años, mientras que el de HPV-16 fue de 69.783 años. Por otra parte, los linajes europeos presentaron un ACMR hace 22.663 años en el caso de JCV y hace 23.602 años para HPV-16. Mientras que los linajes amerindios presentaron un ACMR hace 18.159 años para JCV y 14.755 años en el caso de HPV-16.

En líneas generales, estas fechas proveen un marco temporal factible para la emergencia asociada a las poblaciones descriptas y coincide con aquel determinado para el ADNmt en estas poblaciones (30.000 a 40.000 años en Europa y 15.000 a 20.000 años

en América); a excepción de los linajes africanos que fueron más recientes que lo esperado en el contexto de la hipótesis "fuera de África". El ACMR para el linaje africano en el virus JC fue de 30.942 años y de 29.778 años para HPV-16, siendo que para el ADNmt este linaje posee su ACMR hace 150.000 años aproximadamente (Comas, 2014).

Con respecto a este último, la topología de los árboles obtenidos, para ambos virus, tampoco reflejó un estricto proceso de co-evolución con su hospedador humano dado que los linajes africanos, no fueron basales en las filogenias. Esta situación no es propia de nuestro set de datos y ya ha sido previamente reportada en la literatura (Shackleton *et al.*, 2006; Kitchen *et al.*, 2008; Badano *et al.*, 2014). Entre las posibles causas se propone que los linajes ancestrales africanos podrían encontrarse actualmente extintos, o no haber sido aún muestreados (Cayres-Vallinoto *et al.*, 2012; Kitchen *et al.*, 2007; Shackleton *et al.*, 2006), o podría deberse a la transferencia inter-específica entre virus de homínidos arcaicos (Neandertales y Denisovanos) y nuestra especie (Pimenoff *et al.*, 2016).

Como alternativa, y a partir de los datos obtenidos, es factible proponer que las metodologías de análisis disponibles han permitido describir el proceso de evolución viral geográfico en un período de tiempo que es posterior a la salida de *Homo sapiens* "Fuera de África" (Comas, 2014). De particular interés, la reconstrucción demográfica de cada marcador viral indicó una expansión poblacional, tanto en JCV como en HPV, ocurrida hace aproximadamente 5.000 años, esto probablemente estaría asociado al establecimiento de las primeras civilizaciones humanas, período durante el cual el aumento en el tamaño efectivo de las poblaciones hospedadoras conllevó a un aumento en la probabilidad de transmisión viral, principalmente por la aglomeración de personas en centros urbanos y una expansión poblacional que hasta ese momento no había tenido precedentes en la historia de la humanidad (Aimé *et al.*, 2013).

Si bien estas discusiones exceden los objetivos de este trabajo de Tesis nos proponen nuevos escenarios epidemiológicos e históricos para discutir el origen y dispersión de estos virus asociados a las diferentes poblaciones humanas.

ANÁLISIS DE REDES. PATRONES DEMOGRÁFICOS

La última aproximación realizada en este trabajo para estudiar el poblamiento de Misiones consistió en determinar los patrones demográficos de cada marcador a través de un análisis de Redes. A diferencia de los árboles filogenéticos clásicos, las redes incorporan información sobre la frecuencia de los haplotipos en la población y facilitan la visualización de los patrones demográficos a nivel poblacional (efecto fundador, cuello de botella, flujo génico). Cada secuencia única del ADNmt, al igual que cada genotipo

viral, fue considerada como un haplotipo y los patrones de referencia en la interpretación del gráfico fueron: (i) Efecto fundador: un haplotipo nodal en alta frecuencia y haplotipos derivados del mismo, cada uno en baja frecuencia; y (ii) Mezcla genética: alto número de haplotipos, cada uno en baja frecuencia. (iii) Cuello de botella genético: pocos haplotipos con moderada frecuencia cada uno sin haplotipos derivados.

En el caso del ADN mitocondrial, se obtuvo una red compleja, donde los diferentes *clusters* europeos, asiático-americanos y africanos presentaron procesos de mezcla genética y efecto fundador. Este último proceso, fue particularmente notable para los haplogrupos asiático-americanos A y C (componentes ancestrales de la población) y para el haplogrupo europeo H (el cual presenta un patrón de diversificación más reciente, probablemente asociado a la inmigración europea a la región).

Con respecto al virus JC, la topología general de la red presentó 3 *clusters* mayores para los linajes europeos, asiático-americanos y africanos en frecuencias compatibles con un proceso de mezcla poblacional, sin evidencia de efecto fundador ni de ningún otro proceso demográfico evidente.

Finalmente la Red obtenida para HPV, presentó dos marcados eventos demográficos de efecto fundador en el linaje europeo. Esto podría atribuirse a las dos fuertes irrupciones del virus previamente descritas ocurridas durante la colonización española del siglo XVI y durante la inmigración europea del siglo XX en la región.

Así, cada marcador presentó una sensibilidad diferente para reflejar el proceso de poblamiento de la provincia, probable consecuencia de su tipo de transmisión y/o herencia. Los resultados obtenidos complementan aquellos descritos para las prevalencias de variantes geográficas y ofrecen una nueva perspectiva para los estudios de Antropología molecular en la región.

Conclusiones



VI-CONCLUSIONES

Las principales conclusiones en relación a los objetivos planteados en este trabajo de Tesis se describen a continuación:

I. Se caracterizó la variación genética del ADNmt en 270 individuos residentes de las zonas sur, centro y norte de la Provincia, lo que permitió tener un panorama etno-geográfico para la región. El grado de mestizaje de la población fue del 50,7% asiático-americano, 45,6% europeo y 3,70% africano. El análisis de estructura poblacional indicó una baja diferenciación genética entre las diferentes regiones geográficas.

II. Con respecto a la variación genética viral se analizaron 76 secuencias del gen L1 de HPV-16 y 21 secuencias del gen VP1 de JCV. El análisis filogenético permitió clasificar 2 Linajes (A y D) y 3 sublinajes (A1, A4, D3) para HPV-16; y 3 Tipos (1, 2, 3) y 5 subtipos (1A, 1B, 2A, 2B y 3B) para JCV. El origen geográfico de los mismos fue: 94,74% europeo y 5,26% asiático-americano para HPV-16 y de 33,33% europeo; 19,05% africano y 47,62% asiático-americano para JCV.

La datación molecular y la dinámica de expansión poblacional para cada modelo viral confirmaron que ambos virus se comportan como marcadores moleculares de los movimientos ancestrales de sus hospedadores humanos. En particular, los Linajes asiático-americanos presentaron un ACMR de 14.000 años (JCV) y 18.000 años (HPV-16); fechas que coinciden con aquellas previamente establecidas para poblamiento de América (ADNmt aprox. 15.000 a 20.000 años) y provee un marco temporal factible para la emergencia de estos linajes virales en el continente.

Ambos virus presentaron una expansión poblacional hace aproximadamente 5.000 años, y se considera como escenario histórico que explica este aumento de la transmisión viral, el establecimiento de las civilizaciones humanas.

III. En el marco del poblamiento de la provincia, se propone que los diferentes linajes de JCV y HPV habrían ingresado a través del proceso de miscegenación de varios grupos étnicos durante la ocupación del territorio.

Los análisis de redes permitieron describir estos procesos demográficos los cuales presentaron características propias para cada marcador. Brevemente, el ADNmt identificó los 3 componentes étnicos (Amerindio, Europeo y Africano) en un patrón característico de poblaciones mezcladas. El componente amerindio fue predominante y los haplotipos europeos H presentaron un patrón que refleja un efecto fundador en este

linaje. Este último podría ser producto del ingreso de inmigrantes europeos durante el SXX a la región.

La Red de Haplotipos de JCV también identificó los 3 componentes en la población en un patrón de frecuencias compatibles con mezcla poblacional. A diferencia del ADNmt, los linajes Africanos fueron más frecuentes ($p > 0.05$). Este resultado podría ser atribuido a la circulación de linajes virales de origen Africano provenientes del Brasil, destacándose que el 25.8% de la población muestreada indicó que sus abuelas maternas habían nacido en este país. Se propone que, por su tipo de transmisión (horizontal-intrafamiliar) JCV podría ser un marcador más sensible para capturar la dinámica de este proceso migratorio que el ADNmt.

Finalmente, la Red de Haplotipos de HPV-16 presentó un fuerte componente europeo caracterizado por dos eventos de efecto fundador en la población. Esto podría atribuirse a dos fuertes irrupciones del virus, una durante la colonización española del siglo XVI y otra durante la inmigración europea del siglo XX en la región. Los haplotipos amerindios fueron minoritarios y no se detectó el componente Africano. En su conjunto, HPV-16 fue marcadamente diferente al patrón del ADNmt y JCV pero notablemente similar a los reportes de ancestralidad para el cromosoma Y en la Argentina.

IV- Este trabajo constituye el primer registro de un estudio sobre el perfil genético de una población empleando simultáneamente marcadores genéticos humanos y virales. Los resultados obtenidos ofrecen una nueva perspectiva para los estudios de Antropología molecular.

Bibliografía



VII-BIBLIOGRAFÍA

1. Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt HJ. (2008). The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One* 12;3(3):e1764. doi: 10.1371/journal.pone.0001764.
2. Agostini HT, Deckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, Prost MG, Frias C, Pérez-Trallero E, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. (2001). Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J Gen Virol.* May;82(Pt 5):1221-331.
3. Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. (1997). Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 23;94(26):14542-6.
4. Aimé C, Laval G, Patin E, Verdu P, Ségurel L, Chaix R, Hegay T, Quintana-Murci L, Heyer E, Austerlitz F. (2013). Human genetic data reveal contrasting demographic patterns between sedentary and nomadic populations that predate the emergence of farming. *Mol Biol Evol.* Dec;30(12):2629-44. doi: 10.1093/molbev/mst156.
5. Akaike, H., (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19, 716–723. doi:10.1109/TAC.1974.1100705
6. Albizua Verdinelli, M.E., Balangero, M., Blanco, S., Gallego, F., Collino, C., Frutos M.C. & Gallego, S.V. (2016). Evidencia Molecular de la Infección por los Virus JC y BK en Individuos Portadores de VIH en la Ciudad de Córdoba, Argentina
7. Alegre R, Moscoso J, Martinez-Laso J, Martin-Villa M, Suarez J, Moreno A, Serrano-Vela JI, Vargas-Alarcon G, Pacheco R, Arnaiz-Villena A. (2007) HLA genes in Cubans and the detection of Amerindian alleles. *Mol Immunol.* Mar;44(9):2426-35.
8. Altuna ME, Modesti NM, Demarchi DA. (2006)Y-chromosomal evidence for a founder effect in Mbyá-guaraní Amerindians from northeast Argentina. *Hum Biol.* Oct;78(5):635-9.
9. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* Oct;23(2):147.
10. Ault GS, Stoner GL. (1992) Two major types of JC virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region DNA sequences. *J Gen Virol.* Oct;73 (Pt 10):2669-78.
11. Assetta B, Atwood WJ. (2017) The biology of JC polyomavirus. *Biol Chem.* Jul 26;398(8):839-855. doi: 10.1515/hsz-2016-0345.
12. Badano I, Pedrozo RW, Ruíz Díaz LS, Galuppo JA, Picconi MA, Campos RH, Liotta DJ. (2011) Human papillomavirus (HPV) detection and Papanicolaou cytology in low-resource women in Posadas city, Misiones, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* Oct-Dec;43(4):263-7. doi: 10.1590/S0325-75412011000400005
13. Badano I, Sanabria DJ, Totaro ME, Rubinstein S, Gili JA, Liotta DJ, Picconi MA, Campos RH, Schurr TG. (2018) Mitochondrial DNA ancestry, HPV infection and the risk of cervical cancer in a

- multiethnic population of northeastern Argentina. *PLoS One*. Jan 12;13(1):e0190966. doi: 10.1371/journal.pone.0190966
14. Badano I, Totaro ME, Culasso AC, Sanabria DJ, Schurr TG, Balette IC, Roisman A, Basiletti J, Picconi MA, Campos RH, Liotta DJ. (2015) Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. *Infect Genet Evol*. Jan;29:103-9. doi: 10.1016/j.meegid.2014.11.013.
 15. Badano, I., Stietz, S.M., Schurr, T.G., Picconi, A.M., Fekete, D., Quintero, I.M., Cabrera, M.D.E., Campos, R.H., Liotta, J.D., (2012). Analysis of TNF α promoter SNPs and the risk of cervical cancer in urban populations of Posadas (Misiones, Argentina). *J. Clin. Virol.* 53, 54–9. doi:10.1016/j.jcv.2011.09.030
 16. Bandelt HJ, Achilli A, Kong QP, Salas A, Lutz-Bonengel S, Sun C, Zhang YP, Torroni A, Yao YG. (2005) Low "penetrance" of phylogenetic knowledge in mitochondrial disease studies. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 22;333(1):122-30.
 17. Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48
 18. Bartolomé L (1975). Colonos, plantadores y agroindustrias. *Desarrollo Económico* Vol. 15, N° 58.
 19. Bartolomé, Leopoldo (1982): "Base social e ideología en las movilizaciones agraristas en Misiones entre 1971 y 1975" en: *Desarrollo Económico. Revista de Ciencias Sociales*. Buenos Aires. IDES N° 85 Vol. 22. Abril- Junio
 20. Bartolomé, Leopoldo (2000) *Los colonos de Apóstoles: estrategias adaptativas y etnicidad en una colonia eslava de Misiones* (Posadas: Editorial Universitaria).
 21. Berger, J.R., Miller, C.S., Danaher, R.J., Doyle, K., Simon, K.J., Norton, E.,...Neltner, M.D. (2017). Distribution and Quantity of Sites of John Cunningham Virus Persistence in Immunologically Healthy Patients: Correlation with John Cunningham Virus Antibody and Urine John Cunningham Virus DNA. *Journal of the American Medical Association neurology*, 74(4), 437-444. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.5537
 22. Bonaventura, R., Martínez, L.M., Mariotti, Y.A. & Freire, M.C. (2017). DIAGNÓSTICO DE POLIOMAVIRUS JC - EXPERIENCIA DE 10 AÑOS. XI Congreso Argentino de Virología. Simposio de Virología Clínica. Sociedad Argentina de Virología, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
 23. Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Apr;76(4):1967-71.
 24. Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG, Scozzari R, Cruciani F, Wallace DC. (1998) mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *Am J Hum Genet*. Dec;63(6):1852-61.
 25. Buck, C. B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E. M., Tisza, M. J., An, P.,...Varsani, A. (2016). The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS pathogens*, 12(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1005574
 26. Burd EM. (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. Jan;16(1):1-17. Review.
 27. Burk RD, Harari A, Chen Z. (2013) Human papillomavirus genome variants. *Virology*. Oct;445(1-2):232-43. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.018. Epub 2013 Aug 31. Review.

28. Calvignac-Spencer S, Feltkamp MC, Daugherty MD, Moens U, Ramqvist T, Johne R, Ehlers B. (2016) A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch Virol.* Jun;161(6):1739-50. doi: 10.1007/s00705-016-2794-y.
29. Catelli ML, Alvarez-Iglesias V, GoÁmez-Carballa A, Mosquera-Miguel A, Romanini C, Borosky A, (2011) The impact of modern migrations on present-day multi-ethnic Argentina as recorded on the mitochondrial DNA genome. *BMC Genet.*; 12: 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-77> PMID: 21878127
30. Cayres-Vallinoto, I.M., Vallinoto, A.C., Azevedo, V.N., Machado, L.F., Ishak Mde, O.,... Ishak, R. (2012). Human JCV infections as a bio-anthropological marker of the formation of Brazilian Amazonian populations. *PloS one*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046523
31. Cayres-Vallinoto IM, Vallinoto AC, Pena GP, Azevedo VN, Machado LF, Ishak Mde O, Ishak R. (2016) JC virus/human immunodeficiency virus 1 co-infection in the Brazilian Amazonian region. *Braz J Infect Dis.* Jul-Aug;20(4):360-4. doi: 10.1016/j.bjid.2016.05.005.
32. Cedeno, F., Penalva, A.C., Vidal, J.E. & Trujillo, J.R. (2006). Virus neurotrópicos: el virus JC y la leucoencefalopatía multifocal progresiva. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 7(1), 46-54
33. Chan SY, Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H. (1992) Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol.* Oct;66(10):5714-25.
34. Chiesa IJ, Perez MS, Nuñez GG, Pirola DA. (2016) Genetic variability and phylogeny analysis of partial L1 gene of human papillomavirus variants in Buenos Aires, Argentina. *Virusdisease.* Mar;27(1):41-7. doi: 10.1007/s13337-015-0295-3.
35. Comas, D. (2014). La genética de las migraciones humanas. *Mètode Science Studies Journal*, 4. doi: 10.7203/metode.81.3088.
36. Corach D, Lao O, Bobillo C, van Der Gaag K, Zuniga S, Vermeulen M, (2010) Inferring continental ancestry of argentineans from Autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA. *Ann Hum Genet.*; 74: 65±76. doi.org/10.1111/j.1469-1809.2009.00556.x PMID: 20059473
37. Corti, M., Villafañe, M.F., Trione, N., Yampolsky, C. & Sevrer, G. (2013). Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Presenting as IRIS in an AIDS Patient. *The neuroradiology journal*, 26(2), 151–154. doi: 10.1177/197140091302600203.
38. Cui X, Wang JC, Deckhut A, Joseph BC, Eberwein P, Cubitt CL, Ryschkewitsch CF, Agostini HT, Stoner GL. (2004) Chinese strains (Type 7) of JC virus are afro-asiatic in origin but are phylogenetically distinct from the Mongolian and Indian strains (Type 2D) and the Korean and Japanese strains (Type 2A). *J Mol Evol.* May;58(5):568-83.
39. Dalianis T, Hirsch HH. (2013) Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology.* Mar 15;437(2):63-72. doi: 10.1016/j.virol.2012.12.015. Epub 2013 Jan 26. Review.
40. Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772. doi:10.1038/nmeth.2109
41. de Villiers EM, Gunst K, Stein H, Scherübl H. (2004) Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences. *Int J Cancer.* Mar 20;109(2):253-8.

42. Delbue S, Comar M, Ferrante P. (2017) Review on the role of the human Polyomavirus JC in the development of tumors. *Infect Agent Cancer*. Feb 3;12:10. doi: 10.1186/s13027-017-0122-0. eCollection 2017. Review.
43. Diez-Repetto, A. (2004). Estudio poblacional de comunidades guaraníes de Misiones, mediante marcadores moleculares de ADN mitocondrial y cromosoma Y. Thesis, FCEQyN, Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina
44. Drummond, A.J., Rambaut, A., (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214. doi:10.1186/1471-2148-7-214
45. Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G., (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1185–92. doi:10.1093/molbev/msi103
46. Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
47. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. Mar;71(3):2449-56.
48. Fernandez-Cobo M, Agostini HT, Britez G, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. (2002) Strains of JC virus in Amerind-speakers of North America (Salish) and South America (Guaraní), Na-Dene-speakers of New Mexico (Navajo), and modern Japanese suggest links through an ancestral Asian population. *Am J Phys Anthropol*. Jun;118(2):154-68.
49. Fernandez-Cobo M, Jobes DV, Yanagihara R, Nerurkar VR, Yamamura Y, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. (2001) Reconstructing population history using JC virus: Amerinds, Spanish, and Africans in the ancestry of modern Puerto Ricans. *Hum Biol*. Jun;73(3):385-402.
50. Forster P, Torroni A, Renfrew C, Röhl A (2001) Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol Biol Evol* 18:1864-1881.
51. Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. (1984) Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol*. Aug;51(2):458-69.
52. Gallero, C.M., Krautstolf, E.M., (2010). Proceso de poblamiento y migraciones en la provincia de Misiones, Argentina (1881-1970). *Rev. Antropol*. Avá 16, 245–264.
53. García A, Pauro M, Bailliet G, Bravi CM, Demarchi DA. (2018) Genetic variation in populations from central Argentina based on mitochondrial and Y chromosome DNA evidence. *J Hum Genet*. Apr;63(4):493-507. doi: 10.1038/s10038-017-0406-7.
54. García A, Demarchi DA (2009). Incidence and distribution of Native American mtDNA haplogroups in central Argentina. *Hum Biol*. Feb;81(1):59-69. doi: 10.3378/027.081.0105.
55. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, Holmes EC. (2004) Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science*. Jan 16;303(5656):327-32. Review.
56. Guerreiro-Junior V, Bisso-Machado R, Marrero A, Hünemeier T, Salzano FM, Bortolini MC. (2009) Genetic signatures of parental contribution in black and white populations in Brazil. *Genet Mol Biol*. Jan;32(1):1-11. doi: 10.1590/S1415-47572009005000001.

57. Gravitt PE, Winer RL. (2017) Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. *Viruses*. Sep 21;9(10). pii: E267. doi: 10.3390/v9100267. Review.
58. Heled, J., Bouckaert, R.R., (2013). Looking for trees in the forest: summary tree from posterior samples. *BMC Evol. Biol.* 13, 1–11. doi:10.1186/1471-2148-13-221
59. Hirsch HH, Kardas P, Kranz D, Leboeuf C. (2013) The human JC polyomavirus (JCV): virological background and clinical implications. *APMIS*. Aug;121(8):685-727. doi: 10.1111/apm.12128. Epub 2013 Jun 19. Review.
60. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. (1993) The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. Nov;67(11):6413-23.
61. Holmes EC. (2004) The phylogeography of human viruses. *Mol Ecol*. Apr;13(4):745-56. Review.
62. Holmes EC. (2008) Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu Rev Microbiol*.;62:307-28. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162912. Review
63. IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponible en <https://www.iarc.fr/>
64. International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). Taxonomy Profile: Polyomaviridae. Consultado en: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/polyomaviridae
65. Ienco EC, Simoncini C, Orsucci D, Petrucci L, Filosto M, Mancuso M, Siciliano G. (2011) May "mitochondrial eve" and mitochondrial haplogroups play a role in neurodegeneration and Alzheimer's disease? *Int J Alzheimers Dis*. Feb 22;2011:709061. doi: 10.4061/2011/709061.
66. Ikegaya, H., Zheng, H.Y., Saukko, P.J., Varesmaa-Korhonen, L., Hovi, T., Vesikari, T.,...Yogo, Y. (2005). Genetic Diversity of JC Virus in the Saami and the Finns: Implications for Their Population History. *American Journal of Physical Anthropology*, 128(1), 185–193. doi: 10.1002/ajpa.20189
67. Ikegaya H, Iwase H, Saukko PJ, Akutsu T, Sakurada K, Yoshino M. (2008) JC viral DNA chip allows geographical localization of unidentified cadavers for rapid identification. *Forensic Sci Int Genet*. Jan;2(1):54-60. doi: 10.1016/j.fsigen.2007.08.009.
68. Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). República Argentina. Disponible en <https://www.indec.gob.ar/>
69. INSTITUTO PROVINCIAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS. Gran Arlas de Misiones. Posadas, Misiones, Argentina. Año 2015. v. I; 430 pág.
70. Kong QP, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, Achilli A, Wang CY, Zhong L, Zhu CL, Wu SF, Torroni A, Zhang YP. (2006) Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum Mol Genet*. Jul 1;15(13):2076-86. Epub 2006 May 19.
71. Kitchen, A., Miyamoto, M.M. & Mulligan, C.J. (2007). Utility of DNA viruses for studying human host history: Case study of JC virus. *Molecular phylogenetics and evolution*, 46(2), 673-682. doi: 10.1016/j.ympev.2007.09.005
72. Kivisild T, Shen P, Wall DP, Do B, Sung R, Davis K, Passarino G, Underhill PA, Scharfe C, Torroni A, Scozzari R, Modiano D, Coppa A, de Knijff P, Feldman M, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. (2006) The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics*. Jan;172(1):373-87.

73. Koutsky L. (1997) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* May 5;102(5A):3-8. Review.
74. Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* Jul;33(7):1870-4. doi:10.1093/molbev/msw054.
75. Lee SR, Han J. (2017) Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev.*;2017:8060949. doi: 10.1155/2017/8060949. Epub 2017 Jun 7. Review.
76. Lima, M.A. (2013). Progressive multifocal leukoencephalopathy: new concepts. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 71(9), 699-702. doi: 10.1590/0004-282X20130154
77. Lopez Hernandez, M.A. (2012). Enfermedad por virus JC. *Medicina Interna de México*, 28(4), 352-359.
78. Lopez, H., Gentile, J.H., Taratuto, A., Bunge, H.J. & Dominguez, R.O. (1985). Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). *Medicina*, 47, 283-288.
79. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. (1998) Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int J Legal Med.*;111(2):67-77. Erratum in: *Int J Legal Med* 1999;112(2):145-50. *Int J Legal Med* 1998;111(5):286.
80. Marrero AR, Silva-Junior WA, Bravi CM, Hutz MH, Petzl-Erler ML, Ruiz-Linares A, Salzano FM, Bortolini MC. (2007) Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang natives of Brazil. *Am J Phys Anthropol.* Feb;132(2):301-10.
81. Martínez Marignac VL, Bertoni B, Parra EJ, Bianchi NO. (2004) Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers. *Hum Biol.*; 76: 543±57. PMID: 15754971
82. Martinez-Sarasola, C. (1992). *Nuestros Paisanos los Indios*. Emecé Editores, Bs. As., 659 páginas.
83. Minin, V.N., Bloomquist, E.W., Suchard, M. a., (2008). Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1459–1471. doi:10.1093/molbev/msn090
84. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD, Sukernik RI, Olckers A, Wallace DC. (2003) Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 7;100(1):171-6.
85. Meyer S, Weiss G, von Haeseler A. (1999) Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics.* Jul;152(3):1103-10.
86. Moens U, Krumbholz A, Ehlers B, Zell R, Johne R, Calvignac-Spencer S, Lauber C. (2017) Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infect Genet Evol.* Oct;54:18-38. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.011. Epub 2017 Jun 17. Review.
87. Mojsiejczuk LN, Torres C, Sevic I, Badano I, Malan R, Flichman DM, Liotta DJ, Campos RH. (2016) Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Misiones, Argentina. *Infect Genet Evol.* Oct;44:34-42. doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.032.
88. Muzzio M, Motti JMB, Paz Sepulveda PB, Yee MC, Cooke T, Santos MR, Ramallo V, Alfaro EL, Dipierri JE, Bailliet G, Bravi CM, Bustamante CD, Kenny EE. (2018) Population structure in Argentina. *PLoS One.* May 1;13(5):e0196325. doi: 10.1371/journal.pone.0196325.

89. Padgett, B.L., Walker, D.L., Zurhein, G.M., Eckroade, R.J. & Dessel, B. (1971). Cultivation of Papova-Like Virus from Human Brain with Progressive Multifocal Leucoencephalopathy. *The Lancet*, 1(7712), 1257-1260. doi: 10.1016/S0140-6736(71)91777-6.
90. Pakendorf B, Stoneking M. (2005) Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*;6:165-83. Review
91. Pimenoff VN, de Oliveira CM, Bravo IG. (2017) Transmission between Archaic and Modern Human Ancestors during the Evolution of the Oncogenic Human Papillomavirus 16. *Mol Biol Evol.* Jan;34(1):4-19. doi: 10.1093/molbev/msw214.
92. Richards M, Macaulay V, Torroni A, Bandelt HJ. (2002) In search of geographical patterns in European mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet.* Nov;71(5):1168-74. Epub 2002 Sep 25.
93. Sabath, B.F. & Major, E.O. (2002). Traffic of JC Virus from Sites of Initial Infection to the Brain: The Path to Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(2). 180–186. doi: 10.1086/344280
94. Sala A, Argüelles CF, Marino ME, Bobillo C, Fenocchio A, Corach D. (2010) Genetic analysis of six communities of Mbyá-Guaraní inhabiting northeastern Argentina by means of nuclear and mitochondrial polymorphic markers. *Hum Biol.* Aug;82(4):433-56. doi: 10.3378/027.082.0406.
95. Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, Richards MB. (2007) Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int.* May 3;168(1):1-13. Epub 2006 Jun 30. Review.
96. Salas A, Jaime JC, Alvarez-Iglesias V, Carracedo A. (2008) Gender bias in the multiethnic genetic composition of central Argentina. *J Hum Genet.*; 53: 662±74. doi.org/10.1007/s10038-008-0297-8 PMID: 18560750
97. Sambuelli, R.H., Gómez, S.J., Armando, R., Theaux, R. & Ciobelina, R. (1987). Leucoencefalopatía multifocal progresiva primaria. Reporte del primer caso confirmado con autopsia en la Argentina. *Portal de Revistas*, 4(1), 23-26.
98. Schiavoni Gabriela, (2015), "El Estado y las empresas en la conformación de la estructura agraria de la Provincia de Misiones(Argentina)", *Boletín Americanista* 72, pp. 31-51, en prensa.
99. Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM, Wallace DC. (1990) Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet.* Mar;46(3):613-23
100. Shackelton, L.A., Rambaut, A., Pybus, O.G. & Holmes, E.C. (2006). JC Virus Evolution and Its Association with Human Populations. *Journal of Virology*, 80(20), 9928–9933. doi: 0.1128/JVI.00441-06.
101. Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Röhl A, Salas A, Oppenheimer S, Macaulay V, Richards MB. (2009) Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am J Hum Genet.* Jun;84(6):740-59. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.05.001.
102. Stern PL. (2005) Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol.* Mar;32 Suppl 1:S72-81. Review.
103. Stoner GL, Jobes DV, Fernandez Cobo M, Agostini HT, Chima SC, Ryschkewitsch CF. (2000) JC virus as a marker of human migration to the Americas. *Microbes Infect.* Dec;2(15):1905-11. Review.

104. Sugimoto C, Hasegawa M, Kato A, Zheng HY, Ebihara H, Taguchi F, Kitamura T, Yogo Y. (2002) Evolution of human Polyomavirus JC: implications for the population history of humans. *J Mol Evol.* Mar;54(3):285-97.
105. Sugimoto C, Kitamura T, Guo J, Al-Ahdal MN, Shchelkunov SN, Otova B, Ondrejka P, Chollet JY, El-Safi S, Ettayebi M, Grésenguet G, Kocagöz T, Chaiyarasamee S, Thant KZ, Thein S, Moe K, Kobayashi N, Taguchi F, Yogo Y. (1997) Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 19;94(17):9191-6.
106. Tan CS, Koranik JJ. (2010) Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol.* Apr;9(4):425-37. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70040-5. Review.
107. Torres C, Barrios ME, Cammarata RV, Cisterna DM, Estrada T, Martini Novas S, Cahn P, Blanco Fernández MD, Mbayed VA. (2016) High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina: Detection of JC, BK, Merkel-cell, Malawi, and human 6 and 7 polyomaviruses. *Sci Total Environ.* Jan 15;542(Pt A):192-202. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.047.
108. Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ. (2006) Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet.* 2006 Jun;22(6):339-45. Epub May 4. Review.
109. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics.* Dec;144(4):1835-50.
110. Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. (1993) Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet.* Sep;53(3):563-90.
111. Torroni A, Schurr TG, Yang CC, Szathmary EJ, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM, (1992) Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics.* Jan;130(1):153-62.
112. Totaro M.E., Badano I., Collado M.S., Campos R.H. y Liotta J.D. (2013). Reporte preliminar sobre la secuenciación del genoma completo de virus papiloma humano tipo 16, agente etiológico del cáncer de cuello de útero. *Jornadas Científico Tecnológicas del 40º Aniversario de la Universidad Nacional de Misiones.* Posadas, Misiones, Argentina. ISBN 978-950-579-268-9
113. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, Forslund O, Haga T, McBride AA, Villa LL, Burk RD, (2018) Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol.* Jun 21. doi: 10.1099/jgv.0.001105.
114. van Oven M, Kayser M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30(E386-E394, <http://www.phylotree.org> doi:10.1002/humu.20921
115. Whiley, D.M., Mackay, I.M. & Sloots, T.P. (2001). Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4357–4361. doi: 10.1128/JCM.39.12.4357-4361.2001.
116. White MK, Khalili K. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy--revisited. *J Infect Dis.* (2011) Mar 1;203(5):578-86. doi: 10.1093/infdis/jiq097. Epub 2011 Jan 12. Review.

117. Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97–159.
118. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. (1997) Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* Mar;71(3):2463-72.
119. Yogo Y, Sugimoto C, Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Kitamura T. (2004) JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Rev Med Virol.* May-Jun;14(3):179-91. Review.
120. Yogo, Y., Zhong, S., Shibuya, A., Kitamura, T. & Homma, Y. (2008). Transcriptional control region rearrangements associated with the evolution of JC polyomavirus. *Virology*, 380(1), 118-123. doi: 10.1016/j.virol.2008.07.016.
121. Zhang H, Burr SP, Chinnery PF. (2018) The mitochondrial DNA genetic bottleneck: inheritance and beyond. *Essays Biochem.* Jul 20;62(3):225-234. doi: 10.1042/EBC20170096.
122. zur Hausen (2000) H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* May 3;92(9):690-8. Review.
123. Zheng, H.Y., Kitamura, T., Takasaka, Q., Chen, Y. & Yogo, Y. (2004). Unambiguous identification of JC polyomavirus strains transmitted from parents to children. *Archives of Virology*, 149(2), 261–273. doi: 10.1007/s00705-003-0214-6.
124. Zhou Y, Holmes EC. (2007) Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of hepatitis B virus. *J Mol Evol.* Aug;65(2):197-205.

Anexos



VIII-ANEXOS

ANEXO I- Consentimiento informado

ANEXO II- Ficha Antropológica empleada en el muestreo

ANEXO III- Protocolos de Biología Molecular utilizados en este trabajo de Tesis

ANEXO IV- Secuencias disponibles en GenBank utilizadas en este trabajo de Tesis

ANEXO V- Arboles generados por el método NJ

ANEXO VI- Haplotipos de ADN mitocondrial

ANEXO I- Consentimiento informado

ACUERDO VOLUNTARIO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio del presente documento y teniendo plena capacidad de mis facultades mentales, *doy mi consentimiento y me ofrezco voluntariamente* para participar de la investigación ESTUDIOS GENÉTICOS DEL POBLAMIENTO DE MISIONES A TRAVÉS DEL USO DE MARCADORES UNIPARENTALES (ADNmt y Cromosoma Y), bajo la dirección del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAp) perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM) con domicilio en la Av. Mariano Moreno 1375 de la ciudad de Posadas (CP3300), Provincia de Misiones, Argentina.

Entiendo que este estudio empleará muestras biológicas de cepillados/hisopados bucales para la obtención de ADN genómico total, el cual será utilizado para la detección de marcadores moleculares antropológicos (polimorfismos del ADNmt y del Cromosoma Y). Sé que la información que sobre mi se obtenga como producto de la participación de este estudio podrá ser empleada en ámbitos científicos para favorecer el adelanto de las ciencias biomédicas bajo la condición de que se preservará el carácter de confidencialidad de mi persona y de cualquier dato vinculante a la identidad de la misma.

Tengo conocimiento que los investigadores responsables de este proyecto están en un todo de acuerdo y adoptan los principios éticos, legales y jurídicos para las investigaciones médicas en seres humanos descritas en las normas bioéticas nacionales (*Disp. ANMAT 5330/97*) e internacionales (*Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y sus modificaciones, Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos de la UNESCO 11/11/97*), destacando el derecho a la privacidad genética, incluyendo el derecho a prevenir la toma o almacenamiento de muestras corporales para información genética sin el voluntario consentimiento informado.

Dejo explícito que se me ha puesto en conocimiento del significado de mi participación voluntaria, la duración y finalidad del estudio, los métodos diagnósticos a ser empleados y el alcance de los resultados a ser obtenidos, tomando conocimiento de este último a través de mi médico tratante el cual será informado por el laboratorio. Así mismo he tenido la oportunidad de realizar preguntas referidas a este estudio y las respuestas recibidas han sido todas satisfactorias.

Sé que dispongo de plena libertad de discontinuar mi participación en este estudio en el momento que así lo desee, debiendo por ello notificar por escrito al Dr. Domingo Javier Liotta, Director del LaBiMAp a la dirección postal previamente citada. Sé que mi exclusión del presente estudio se realizará sin cuestionamiento alguno y se concretará una vez que la mencionada persona se notifique de mi decisión. Mi participación en el presente estudio no implicará gratificación financiera alguna.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA FIRMA

Por medio del presente documento y teniendo plena capacidad de mis facultades mentales, *doy mi consentimiento y me ofrezco voluntariamente* para participar de la investigación médica **ESTUDIOS GENÉTICOS DEL POBLAMIENTO DE MISIONES A TRAVÉS DEL USO DE MARCADORES UNIPARENTALES (ADNmit y Cromosoma Y)**, bajo la dirección del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAp) perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQYN) de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM) con domicilio en la Av. Mariano Moreno 1375 de la ciudad de Posadas (CP3300), Provincia de Misiones, Argentina.

Voluntario

Apellido y Nombre:	
Firma:	Lugar y Fecha
Aclaración:	Nro de Documento:

Testigo 1

Apellido y Nombre:	
Firma:	Lugar y Fecha
Aclaración:	Nro de Documento:

Testigo 2

Apellido y Nombre:	
Firma:	Lugar y Fecha
Aclaración:	Nro de Documento:

ANEXO II- Ficha antropológica empleada en el muestreo.

FICHA DE REGISTRO	
CODIGO:	LOCALIDAD: FECHA:
DATOS DEL VOLUNTARIO	
APELLIDO:	
LUGAR DE RESIDENCIA	
LUGAR DE NACIMIENTO	
AUTODENOMINACIÓN ÉTNICA	
DATOS DE LA MADRE	
APELLIDO:	
LUGAR DE RESIDENCIA	
LUGAR DE NACIMIENTO	
AUTODENOMINACIÓN ÉTNICA	
DATOS DEL PADRE	
APELLIDO:	
LUGAR DE RESIDENCIA	
LUGAR DE NACIMIENTO	
AUTODENOMINACIÓN ÉTNICA	
DATOS DEL ABUELO	
APELLIDO:	
LUGAR DE RESIDENCIA	
LUGAR DE NACIMIENTO	
AUTODENOMINACIÓN ÉTNICA	
DATOS DE LA ABUELA	
APELLIDO:	
LUGAR DE RESIDENCIA	
LUGAR DE NACIMIENTO	
AUTODENOMINACIÓN ÉTNICA	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">Firma del voluntario</div> <div style="text-align: center;">Firma del encuestador</div> </div> <div style="margin-top: 20px;">Lugar y fecha:</div>	

ANEXO III- Protocolos de Biología Molecular utilizados en este trabajo de tesis.

PCR-ADN MITOCONDRIAL

Utilidad: Se emplea para la amplificación de la Región Hipervariable I del ADNmt (HVS-I).

Referencia: Vigilant L *et al.* Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. 1989. Proc Natl Acad Sci U S A. 86(23): 9350-9354.

PRIMER FW: 15977-F

PRIMER RV: 16552-R

5' CCACCATTAGCACCCAAAGC 3'

5' TAAGGGGAACGTGTGGGC 3'

Blanco de amplificación: 575pb de la Región Hipervariable I del ADN mitocondrial

Condiciones de PCR: 100ng de muestra en buffer PCR (200mM Tris-HCL pH 8.4, 500mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 1uM de cada primer, 200uM de cada dNTP, y 2U de Taq polimerasa, en un volumen final de 75ul.

Condiciones de Ciclado: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min. y 36 ciclos de: 95°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min; y una extensión final de 72°C por 3 min.

Resultado: Los amplicones se resuelven en geles de agarosa al 2% teñidos con SyberSafe®, una banda de 575 pb indica amplificación positiva (Figura 1).

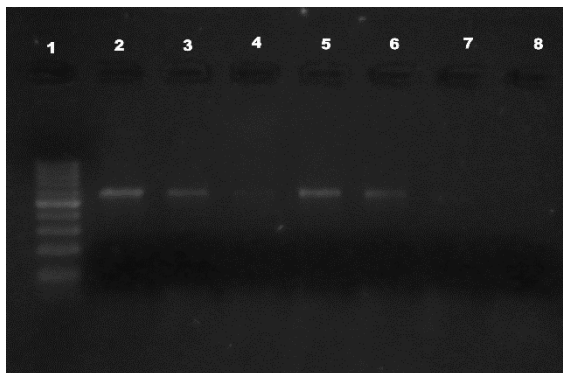


Figura 1. Electroforesis en Gel de Agarosa 2%. Productos amplificados por PCR para la HVS-I del ADNmt (575pb). Calle 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb (Cada banda representa 100 pb). Calles 2-5: Muestras Positivas. Calle 6: Control Positivo. Calle 7 y 8: Controles Negativos.

PCR-JCV REGIÓN PARCIAL VP1/VP2

Utilidad: Se emplea para amplificar la región superpuesta que codifica las proteínas VP1/VP2 (región parcial VP1/VP2) del poliovirus JC.

Referencia: Torres *et al.* "High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina: Detection of JC, BK, Merkel-cell, Malawi, and human 6 and 7 polyomaviruses. *Sci Total Environ.* 2016 Jan 15;542(Pt A):192-202.

Consiste en una PCR anidada que se realiza a través de los siguientes pares de primers:

Primer ronda:

Primer Fw: JC1

Primer Rv: AS-AP1a

5'-AATGTGCAATCTGGTGAATT-3'

5'-ATGTGGGAGGCTGTNACY-3'

Blanco de amplificación: 439pb

Condiciones de PCR: Buffer PCR 5X (10mM Tris-HCL pH 8.3, 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 0,25mM del primer Fw y 0,35mM del primer Rv, 0,2 mM de dNTPs, y 1,25 U de GoTaq polimerasa, en un volumen final de 25 µl.

Condiciones de Ciclado: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min. y 36 ciclos de: 94°C por 30 seg, 40°C por 30 seg, 72°C por 40 seg; y una extensión final de 72°C por 5 min.

Los amplicones de la primer ronda serán utilizados como templado en la segunda ronda.

Segunda ronda:

Primer Fw: JC3 5'

Primer Rv: AS-AS1

5'-CCTTTACTTTTAGGGTTGTAC-3'

5'-ACAGGTHAGRTCCTCATT-3'

Blanco de amplificación: 325pb

Condiciones de PCR: Buffer PCR 5X (10mM Tris-HCL pH 8.3, 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 0,25µM del primer Fw y 0,35µM del primer Rv, 0,2 mM de dNTPs, y 1,25 U de GoTaq polimerasa, en un volumen final de 25 µl.

Condiciones de Ciclado: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min. y 36 ciclos de: 94°C por 30 seg, 38°C por 30 seg, 72°C por 40 seg; y una extensión final de 72°C por 5 min.

Resultados: Los amplicones se resuelven en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio, una banda de 325 pb indica amplificación positiva de JCV (Figura 3).



Figura 3. Electroforesis en Gel de Agarosa al 2%. Productos amplificados por PCR para la región VP1/VP2 del virus JC. Calles 1 a 4 y 6: Muestras positivas. Calle 5: Muestra negativa. Calle 7: Control positivo. Calle 8: control negativo. Calle 9: marcador interno.

PCR JCV. Región VP1

Utilidad: Se emplea para amplificar el gen VP1 del poliomavirus JC.

Referencia: Torres *et al.* "High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina: Detection of JC, BK, Merkel-cell, Malawi, and human 6 and 7 polyomaviruses. *Sci Total Environ.* 2016 Jan 15;542(Pt A):192-202.

Consiste en una PCR anidada que se realiza a través de los siguientes pares de primers:

Primer ronda:

Primer Fw: JC1

Primer Rv: JC2

5' AATGTGCAATCTGGTGAATT 3'

Los productos de amplificación de la primer ronda se utilizan como templado de la segunda ronda.

Segunda ronda:

Primer Fw: JC3

Primer RV: JC6

5'-CCTTTACTTTTAGGGTTGTAC-3'

Blanco de amplificación: 1200pb

Las condiciones de PCR y de ciclado son las mismas para las dos rondas.

Condiciones de PCR: Buffer PCR 5X (10mM Tris-HCL pH 8.3, 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 0,4 μM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, y 1,25 U de GoTaq polimerasa, en un volumen final de 25 μl.

Condiciones de Ciclado: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min. y 36 ciclos de: 94°C por 30 seg, 40°C por 30 seg, 72°C por 40 seg; y una extensión final de 72°C por 5 min.

Resultados: Los amplicones se resuelven en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio, una banda de 1250 pb aproximadamente indica amplificación positiva de JCV (Figura 4).

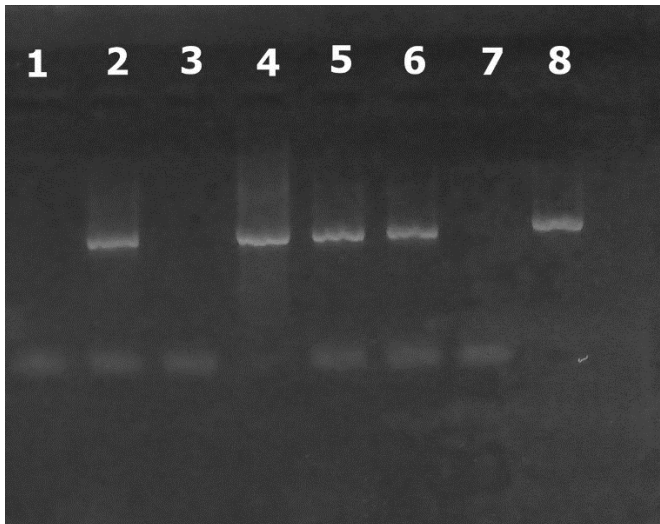


Figura 4. Electroforesis en Gel de Agarosa al 2%. Productos amplificados por PCR para la región VP1 del virus JC. Calles 2, 4 y 5: Muestras positivas. Calles 1 y 3: Muestras negativas. Calle 6: Control positivo. Calle 7: control negativo. Calle 8: marcador interno.

PCR-HPV16 REGIÓN L1

Utilidad: Se emplea para amplificar la región L1 del virus de HPV 16.

Referencia: Totaro, 2013 (Reporte preliminar sobre la secuenciación del genoma completo de virus papiloma humano tipo 16, agente etiológico del cáncer de cuello de útero. JCT. Universidad Nacional de Misiones. Edición Digital ISBN: 978-950-579-270-2)

PRIMER FW: L1 Fw

PRIMER RV: L1 Rv

5'ATG SAG GTG ACT TTT ATT TAC ATC 3' 5'CAG CTT ACG TTT TTT GCG TTT AG 3'

Blanco de amplificación: 1596 pb Posición Del Genoma: 5570-5593/ 7140-7162

Condiciones de PCR: Buffer PCR 1X (10mM Tris-HCL pH 8.3, 50mM KCl), 2,5mM MgCl₂, 1mM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, y 2U de Taq polimerasa, en un volumen final de 75 µl.

Condiciones de Ciclado: desnaturalización inicial de 95°C por 5 min. y 40 ciclos de: 95°C por 1 min, 61°C por 1 min, 72°C por 1 min; y una extensión final de 72°C por 3 min.

Resultados: Los amplicones se resuelven en geles de agarosa al 2% teñidos con SyberSafe®, una banda de 1596 pb indica amplificación positiva (Figura 2).

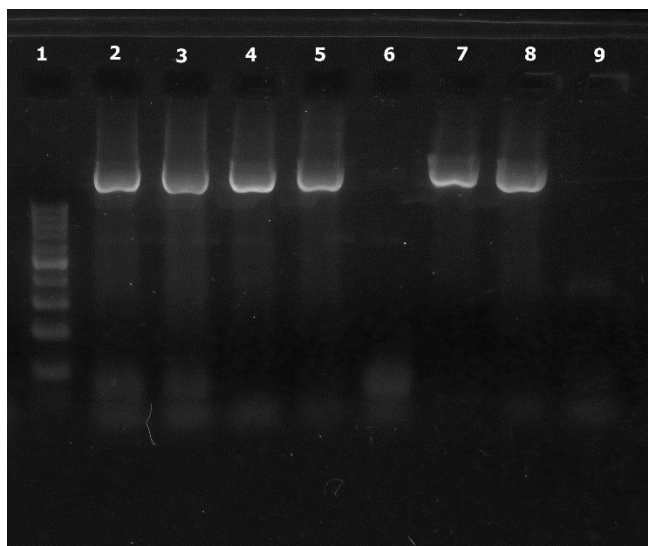


Figura 2. Electroforesis en Gel de Agarosa 2%. Productos amplificados por PCR para la región L1 del virus de Papiloma Humano tipo 16 (1596pb). Calle 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb (Cada banda representa 100 pb). Calles 2 a 5 y 7: Muestras Positivas. Calle 6: Muestra Negativa. Calle 8: Control positivo. Calle 9: Control negativo.

ANEXO IV- Secuencias de referencia disponibles en GenBank utilizadas en este trabajo de Tesis.

A) Secuencias utilizadas en el análisis de JCV

	JCV	Número de acceso- Genbank	Lugar de origen	Fuente	Referencia
	Tipo 1 y 4				
1	1	J02226 J02227	USA	Cerebro de paciente con PML	Frisque <i>et al.</i> (1984)
2	1A	AF015526	USA	Orina	Agostini <i>et al.</i> (1998a)
3	1A	MF662197	Finlandia	Orina	Seppala <i>et al.</i> (2017)
4	1A	MF662191	Finlandia	Orina	Seppala <i>et al.</i> (2017)
5	1A	AB048575	Suecia	-	Sugimoto <i>et al.</i> , 2002
6	1B	JF425081	Alemania	Biofluidos	Reid <i>et al.</i> (2011)
7	1B	JF425030	Alemania	Biofluidos	Reid <i>et al.</i> (2011)
8	1B	JF425268	Suiza	Biofluidos	Reid <i>et al.</i> (2011)
9	1B	KX216370	-	Tejido cerebral	Cahir-McFarland and Doyle (2016)
10	1B	KT354794	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
11	1B	KT354793	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
12	1B	KT354788	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
13	1B	KT354789	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
14	1B	KT354795	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
15	1B	KT354784	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)

Secuencias utilizadas en el análisis de JCV (continuación)

16	1B	KT354790	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
17	1B	KT354786	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
18	1B	KT354791	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
19	1B	KT354787	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
20	1B	KT354792	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
21	1B	KT354785	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
22	4	AF015528	USA	Orina	Agostini <i>et al.</i> (1996)
23	4	MF662205	Finlandia	Orina	Seppala <i>et al.</i> (2017)
24	4	MF662187	Finlandia	Orina	Seppala <i>et al.</i> (2017)
25	4	MF662186	Finlandia	Orina	Seppala <i>et al.</i> (2017)
	Tipo 2				
26	2	AB118657	China	Orina	Zheng and Yogo (2003)
27	2A	AY121907	Corea del Sur	Orina	Cui and Stoner (2002)
28	2A	AF300956	China	Orina	Cui and Stoner (2002)
29	2A	KT354810	Argentina	Orina	Torres <i>et al.</i> (2016)
30	2A	KT354799	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
31	2A	KT354804	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
32	2A	KT354796	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
33	2A	KT354808	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)

Secuencias utilizadas en el análisis de JCV (continuación)

34	2A	KT354807	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
35	2A	KT354802	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
36	2A	KT354803	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
37	2A	KT354812	Argentina	Orina	Torres <i>et al.</i> (2016)
38	2A	KT354806	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
39	2A	KT354798	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
40	2A	KT354805	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
41	2A	KT354809	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
42	2A	KT354801	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
43	2A	KT354797	Argentina	Aguas residuales	Torres <i>et al.</i> (2016)
44	2A	KT354813	Argentina	Orina	Torres <i>et al.</i> (2016)
45	2A	AY121911	Corea del Sur	Orina	Cui and Stoner (2002)
46	2A	AF295733	Puerto Rico	Orina	Stoner <i>et al.</i> (2000)
47	2A	AF295734	Puerto Rico	Orina	Stoner <i>et al.</i> (2000)
48	2B	AB372038	Macedonia	Orina	Zhong and Yogo (2007)
49	2B	AB262398	Sri_Lanka	Orina	Zhong and Yogo (2007)
50	2B	AB262400	Sri_Lanka	Orina	Zhong and Yogo (2007)
51	2B	AB372036	Grecia	Orina	Zhong and Yogo (2007)
52	2C	AF015535	USA	Orina	Agostini <i>et al.</i> (1998)

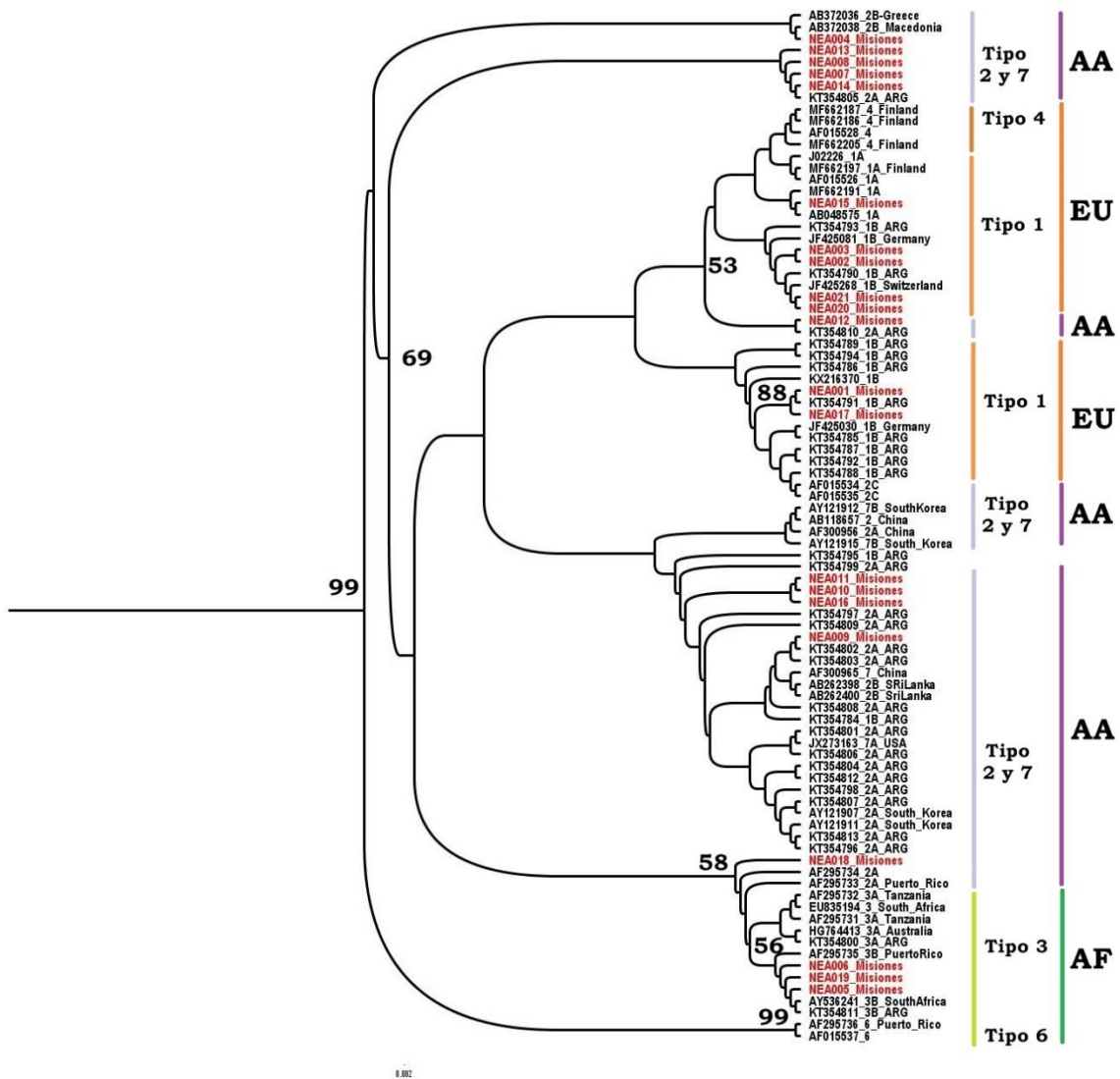
Secuencias utilizadas en el análisis de JCV (continuación)

53	2C	AF015534	USA	orina	Agostini <i>et al.</i> (1998)
	Tipo 3 y 6				
54	3	EU835194	Sudáfrica	Fluido cerebroespinal	Glass and Venter (2009)
55	3A	KT354800	Argentina	Agua de río	Torres <i>et al.</i> (2016)
56	3A	AF295731	Tanzania	Orina	Agostini <i>et al.</i> (1997)
57	3A	AF295732	Tanzania	Orina	Agostini <i>et al.</i> (1997)
58	3A	HG764413	Australia	Biofluidos	Bialasiewicz (2013)
59	3B	AY536241	Sudáfrica	Fluido cerebroespinal	Venter <i>et al.</i> (2004)
60	3B	AF295735	Puerto Rico	Orina	Stoner <i>et al.</i> (2000)
61	3B	KT354811	Argentina	Orina	Torres <i>et al.</i> (2016)
62	6	AF015537	USA	Tejido cerebral	Agostini <i>et al.</i> (1998)
63	6	AF295736	Puerto Rico		Stoner <i>et al.</i> (2000)
	Tipo 7				
64	7	AF300965	China	Orina	Cui and Stoner (2002)
65	7A	JX273163	USA		Lednický <i>et al.</i> (2012)
66	7B	AY121912	Corea del Sur	Orina	Cui and Stoner (2002)
67	7B	AY121915	Corea del Sur	Orina	Cui and Stoner (2002)

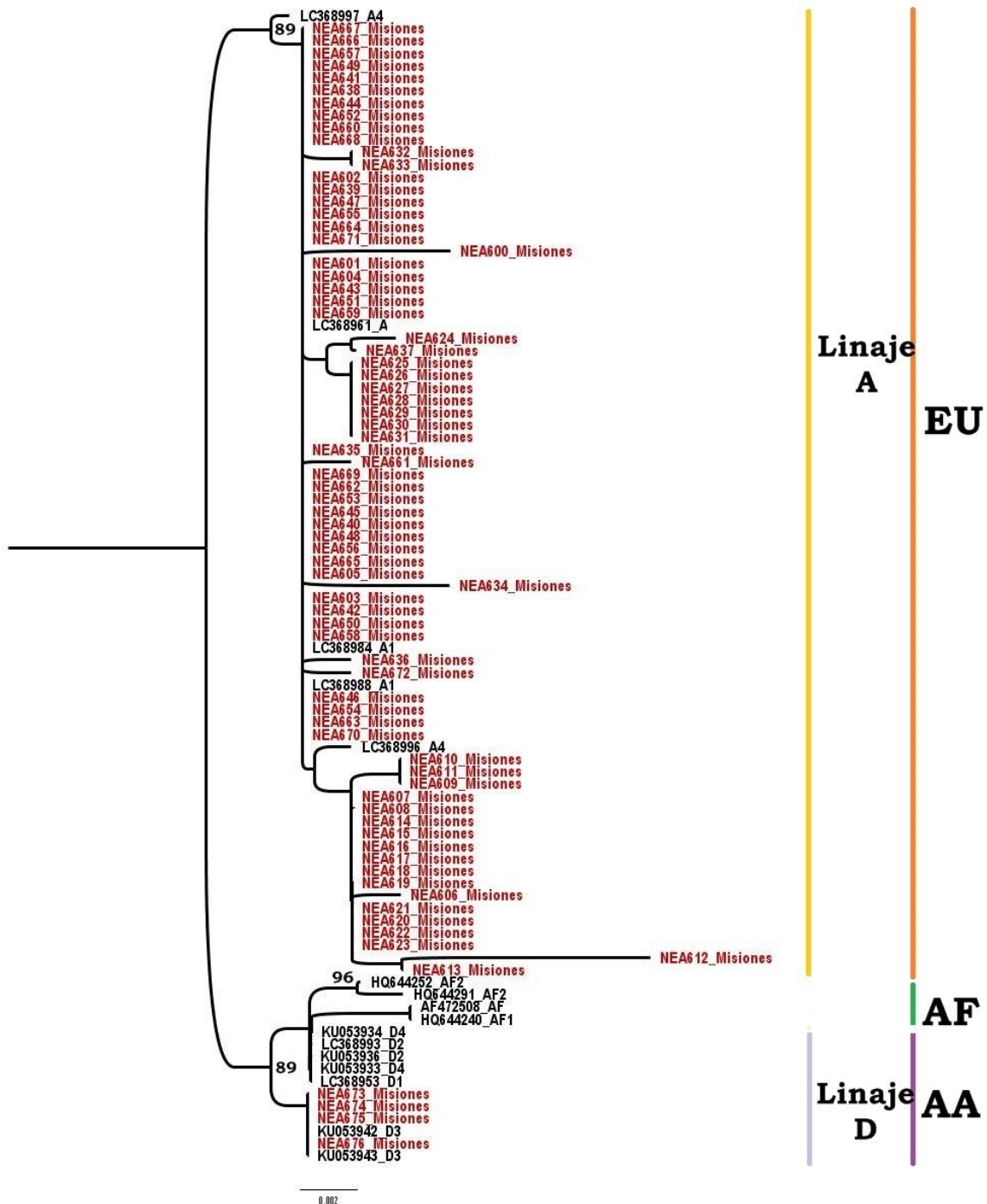
B) Secuencias utilizadas en el análisis de HPV

	Variante de HPV	Número de acceso-Genbank	Referencia
	Europeas		
1	A1	LC368988	Hirose Y. <i>et al.</i> , 2018
2	A1	LC368984	Hirose Y. <i>et al.</i> , 2018
3	A2	LC368961	Hirose Y. <i>et al.</i> , 2018
	Asiático-americanas		
4	D1	LC368953	Hirose Y. <i>et al.</i> , 2018
5	D2	KU053936	Chen,Z. y Burk,R., 2016
6	D2	LC368993	Hirose Y. <i>et al.</i> , 2018
7	D3	KU053942	Chen,Z. y Burk,R., 2016
8	D3	KU053943	Chen,Z. y Burk,R., 2016
9	D4	KU053933	Chen,Z. y Burk,R., 2016
10	D4	KU053934	Chen,Z. y Burk,R., 2016
	Africanas		
11	AF1	HQ644240	Chen,Z. y Burk,R., 2012
12	Af2	HQ644291	Chen,Z. y Burk,R., 2012
13	Af2	HQ644252	Chen,Z. y Burk,R., 2012
14	AF	AF472508	Terai,M., Ma,Z. y Burk,R.D., 2016

ANEXO V- Árboles generados por el método NJ



Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen VP1 del virus JC con secuencias de referencia publicadas en Genbank. En rojo se indican las secuencias de Misiones. EU:: linaje europeo (naranja), AA: linaje asiático-americano (violeta), AF: linaje africano (verde). Árbol generado por el método de Neiborn joining (NJ) bajo el modelo de sustitución TN+93 G+I. En cada nodo se indican los valores de bootstrap superiores a 50.



Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen L1 del virus HPV-16 con secuencias de referencia publicadas en Genbank. En rojo se indican las secuencias de Misiones. EU:: linaje europeo (naranja), AA: linaje asiático-americano (violeta), AF: linaje africano (verde). Árbol generado por el método de Neiborn joining (NJ) bajo el modelo de sustitución TN+93 G+I. En cada nodo se indican los valores de bootstrap superiores a 50.

ANEXO VI- Haplotipos del ADNmt

HAPLOTIPO	SNPs	HAPLOGRUPO	LINAJE	FRECUENCIA
1	16104T-16111T-16189C-16223T-16290T-16319A	A	AA	2
2	16111T-16223T-16290T-16319A-16362C	A	AA	11
3	16126C-161223T-16278T-16290T-16319A-16362C	A	AA	3
4	16111T-16223T-16269G-16290T-16319A-16360T-16362C	A	AA	1
5	16111T-16223T-16290T-16319A-16324C-16362C	A	AA	1
6	16111T-16126C-16223T-16259T-16290T-16319A-16327T-16362C-16519C	A	AA	2
7	16111T-16187T-16223T-16290T-16319A-16362C	A	AA	1
8	16126C-16223T-16278T-16290T-16310A-16319A-16362C-16519C	A	AA	2
9	16129A-16223T-16290T-16319A-16362C	A	AA	1
10	16111T-16124C-16220G-16223T-16290T-16319A-16362C	A	AA	1
11	16051G-16111T-16223T-16267T-16290T-16293G-16319A-16362C	A	AA	1
12	16111T-16189C-16223T-16256T-16290T-16319A-16362C	A	AA	1
13	16223T-16290T-16319A-16362C-16527C	A	AA	1
14	16092C-16111T-16223T-16290T-16319A-16362C-16468C-16519C	A	AA	1
15	16111T-16160T-16223T-16290T-16319A-16362C	A	AA	1
16	16051G-16111T-16223T-16290T-16319A-16362C	A	AA	1
17	16084A-16111T-16215G-16223T-16290T-16319A-16362C	A	AA	1

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
18	16111T-16189C	A	AA	1
19	16096T-16111T-16223T-16290T-16291T-16319A-16362C	A	AA	1
20	16111T-16223T-16266T-16290T-16319A-16362C-16519C	A	AA	1
21	16111T-16192T-16223T-16274A-16319A-16362C	A	AA	1
22	16097C-16098G-16111T-16223T-16319A-16320T-16356C-16362C	A	AA	1
23	16111T-1629A-16224C-16290T-16319A-16362C	A	AA	2
24	16111T-16223T-16290T-16319A-16362C-16519C	A	AA	1
25	16178C-16183C-16189C-16217C-16219G	B	AA	1
26	16182C-16183C-16189C-16217C	B	AA	2
27	16178C-16183C-16189C-16217C-16298C	B	AA	2
28	16183C-16189C-16217C-16316G	B	AA	1
29	16183C-16189C-16217C	B	AA	5
30	16178C-16183C-16189C-16217C	B	AA	1
31	16183C-16189C-16217C-16235G-16301T	B	AA	1
32	16189C-16217C-16220G	B	AA	1
33	16166G-16178C-16182C-16183C-16189C-16217C-16249C-16312G-16344T	B	AA	1
34	16182C-16183C-16189C-16217C-16249C-16312G-16344T	B	AA	1
35	16142T-16183C-16189C-16261T-16483A	B	AA	1

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
36	16132T-16183C-16189C-16261T	B	AA	2
37	16168T-16182C-16183C-16189C-16217C-16249C-16270G-16312G	B	AA	1
38	16183C-16189C-16217C	B	AA	1
39	16092C-16182C-16183C-16189C-16217C-16241G	B	AA	1
40	16168C-16182C-16183C-16189C-16217C-16249C-16312G	B	AA	1
41	16148T-16182C-16183C-16188T-16189C-16217C-16519C	B	AA	1
42	16096T-16183C-16188T-16189C-16217C-16519C	B	AA	1
43	16172C-16182C-16183C-16186T-16189C-16217C-16519C	B	AA	1
44	16182C-16183C-16189C-16311C	B	AA	1
45	16183C-16189C-16311C-16217C	B	AA	1
46	16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	8
47	16126C-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	3
48	16223T-16298C-16320T-16325C-16327T	C	AA	1
49	16195G-16223T-16292T-16298C-16325C-16327T-16362C	C	AA	1
50	16223C-16325C-16327T	C	AA	1
51	16126C-16223T-16270T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
52	16223T-16298C-16325C-16390A-16519C	C	AA	1
53	16223T-16270T-16298C-16325C-16327T	C	AA	2

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
54	16051G-16223T-16247G-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
55	16051G-16093C-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
56	16162G-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
57	16187T-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
58	16051G-16223T-16287T-16298C-16311C-16325C-16327T	C	AA	1
59	16223T-16298C-16325C-16327T-16362C	C	AA	3
60	16223T-16287T-16298C-16311C-16325C-16327T	C	AA	1
61	16092C-16096A-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
62	16223T-16298C-16319A-16325C-16327T	C	AA	1
63	16154C-16223T-16298C-16325C-16327T-16519C	C	AA	2
64	16173C-16192T-16223T-16298C-16325C-16327T-16346A-16519C	C	AA	2
65	16223T-16295T-16298C-16319A-16325C-16327T	C	AA	1
66	16051G-16172C-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
67	16051G-16172C-16223T-16295T-16298C-16325C-16327T-16355G	C	AA	1
68	16176T-16223T-16298C-16311C-16325C-16327T	C	AA	2
69	16136C-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
70	16051G-16223T-16266T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
71	16093C-16192T-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
72	16193T-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
73	16223T-16265C-16298C-16325C-16327T-16362C	C	AA	1
74	16093C-16223T-16264T-16287T-16298C-16311C-16325C-16327T	C	AA	2
75	16266G-16298C-16325C-16327T-16335G-16362C	C	AA	1
76	16127G-16223T-16234T-16279G-16298C-16310T-16325C-16327T	C	AA	2
77	16126C-16172C-16223T-16270T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
78	16223T-16298C-16311C-16325C-16327T	C	AA	1
79	16176T-16223T-16298C-16325C-16327T	C	AA	1
80	16172C-16223T-16256T-16298C-16325C-16327T-16519C	C	AA	1
81	16223T-16242T-16311C-16325C-16362C	D	AA	2
82	16223T-16325C-16362C-16519C	D	AA	5
83	16142T-16179T-16223-16295T-16325C-16362C-16497G-16519C	D	AA	4
84	16179T-16223T-16325C-16362C	D	AA	1
85	16223T-16325C-16362C	D	AA	1
86	16187T-16189C-16209C-16223T-16325C-16362C	D	AA	1
87	16172C-16223T-16239T-16325C-16362C	D	AA	1
88	16223T-16224C-16325C-16362C-16519C	D	AA	1

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
89	16223T-16242T-16311C-16325C-16356C-16362C	D	AA	1
90	16037G-16274A-16519C	H	EU	1
91	16129A-16249C-16519C	H	EU	1
92	16195C-16519C	H	EU	1
93	CRS	H	EU	18
94	16357C-16519C	H	EU	4
95	16188A-16294A-16519C	H	EU	1
96	16193T-16219G-16362C-16482G	H	EU	1
97	16304C	H	EU	1
98	16092C-16293G-16311C	H	EU	1
99	16310G-16319T-16361C	H	EU	1
100	16093C-16221T-16519C	H	EU	1
101	16093C-16519C	H	EU	2
102	16189C-16278T-16293G-16311C	H	EU	1
103	16291T-16519C	H	EU	1
104	16124C-16354T-16519C	H	EU	3
105	16162G-16209C-16519C	H	EU	1
106	16293G-16519C	H	EU	1

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
107	16233G	H	EU	3
108	16111C-16209C-16218T-16519C	H	EU	1
109	16114T	H	EU	1
110	16162G-16278T-16519C	H	EU	1
111	16093C-16265G-16519C	H	EU	2
112	16184T-16519C	H	EU	1
113	16093C-16162G-16209C-16320T-16519C	H	EU	1
114	16093C-16145A	H	EU	1
115	16093C-16221T-16311C-16519C	H	EU	1
116	16069T-16320T-16519C	H	EU	1
117	16311C-16519C	H	EU	3
118	259T-311C-519C	H	EU	2
119	16298C-16519C	HV-V	EU	6
120	16256T-16298C-16519C	HV	EU	2
121	16189C-16298C-16362C	HV	EU	1
122	16153A-16298C	HV	EU	1
123	16129A-16223T -16391A-16519C	I	EU	1
124	16129A-16172C-16223T-16311C-16391A-16519C	I	EU	2

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
125	16069T-16126C-16320T	J	EU	1
126	16063C-16069T-16126C	J	EU	1
127	16069T-16092C-16126C-16261T	J	EU	1
128	16069T-16126C-16145A-16172C-16222T-16260T-16261T	J	EU	1
129	16069T-16092C-16126C-16261T-16311C-16519C	J	EU	1
130	16069T-16126C-16172C-16183C-16184A-16189C	J	EU	1
131	16069T-16126C-16319A	J	EU	1
132	16069T-16126C-16172C	J	EU	3
133	16069T-16126C	J	EU	1
134	16222T-16224C-16270T-16311C-16519C	K	EU	1
135	16223T-16224C-16234T-16311C-16519C	K	EU	1
136	16224C-16270T-16311C	K	EU	1
137	16224C-16311C-16519C	K	EU	4
138	16129 ^a -16224C-16311C-16519C	K	EU	1
139	16126C-16187T-16294T-16296T-16519C	T	EU	2
140	16126C-16294T-16296T-16304C-16519C	T	EU	5
141	16126C-16234T-16248T-16292T-16294T-16519C	T	EU	1
142	16126C-16163G-16186T-16189C-16294T-16519C	T	EU	1

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
143	16144C-16189C-16194G-16270C-16475A	U	EU	1
144	16265G-16356C-16362C-16519C	U	EU	2
145	16192T-16270T-16274A-16519C	U	EU	1
146	16311C-16343G-16390A-16519C	U	EU	1
147	16192T-16256T-16270T-16271C-16291T-16399G	U	EU	1
148	16092C-16163G-16172C-16219G-16311C-16519C	U	EU	1
149	16189C-16270T-16311C	U	EU	4
150	16129A-16183C-16189C-16249C-16311C	U	EU	1
151	16270T-16319A-16519C	U	EU	1
152	16051G-16129C-16183C-16355T-16362C	U	EU	1
153	16096A-16356C-16519C	U	EU	1
154	16051G-16129C-16183C-16189C-16362C	U	EU	1
155	16209C-16342C	U	EU	1
156	16179T-16320T-16354T-16356C-16519C	U	EU	1
157	16192T-16256T-16270T-16526A	U	EU	1
158	16256T-16270T-16399G	U	EU	1
159	16234T-16298C	V	EU	2
160	16223T-16261T-16292T-16295T-16519C	W	EU	1

Haplotipos del ADNmt (continuación)				
161	16189C-16198G-16224T-16279T-16323G	X	EU	1
162	16223T-16278T-16294T-16309G-16390A-16519C	L1	AF	1
163	16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C-16519C	L1	AF	1
164	16129A-16163G-16187T-16189C-16209C-16223T-16278T-16293G-16294T-16311C-16360T-16519C	L1	AF	1
165	16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16311C-16519C	L1	AF	1
166	16172C-16187T-16189C-16223T-16265C-16278T-16286G-16294T-16311C-16360T-16519C-16527T	L1	AF	1
167	16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C-16400T-16519C	L1	AF	1
168	16129A-16189C-16192T-16223T-16278T-16294T-16309G-16390A-16519C	L2	AF	1
169	16189C-16192T-16223T-16264C-16270C-16278T-16294T-16309G-16390A-16519C	L2	AF	1
170	16124C-16223T-16256T-16288C-16368C	L3	AF	1
171	16223T-16264T-16268T-16311C-16390A	L3	AF	1